

Über die enzym- und hydroxylionenkatalysierte Hydrolyse
einiger lokalanästhetisch wirksamer Aminoalkanolester
substituierter Benzoesäuren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Dieter Frank
Frankfurt am Main

1962

1963

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



Dekan: Prof. Dr. Th. Wieland

1.Referent: Prof. Dr. C.Rohmann

2.Referent: Priv.Doiz.Dr. Th.Eckert

Tage der mündlichen Prüfung: 21. u. 22.2.1963.

Tag der Promotion: 27.2.1963.

Inhaltsübersicht

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	4
2 <u>Allgemeiner Teil</u>	7
2.1 Enzymkatalysierte Esterhydrolyse	7
2.2 Hydroxylionenkatalysierte Esterhydrolyse	13
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	18
3.1 Zusammenstellung der untersuchten Lokalanästhetika	18
3.2 Die analytische Verfolgung der Esterhydrolyse	23
3.3 Versuchsergebnisse	26
4 <u>Experimenteller Teil</u>	87
4.1 Aufnahme der Absorptionsspektren	87
4.2 Die Untersuchung der enzymkatalysierten Esterhydrolyse	88
4.3 Die Untersuchung der hydroxylionen-katalysierten Esterhydrolyse	101
5 <u>Zusammenfassung</u>	105
6 <u>Literaturverzeichnis</u>	108

1 Einleitung

Die fortschreitenden Erkenntnisse, die mit der systematischen Erforschung der Arzneimittelwirkung gewonnen wurden, zeigten, daß sich die am Anfang stehende Frage nach den Zusammenhängen zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung in dieser einfachen Form nicht beantworten läßt. Der Versuch, allein die Struktur einer Verbindung für die Wirkung verantwortlich zu machen, wurde deshalb bald wieder aufgegeben. Aussichtsreicher gestalteten sich dagegen die Bemühungen, als erkannt worden war, daß die Vorgänge in der lebenden Zelle auch physikalisch - chemischer Natur sind und einer Beeinflussung durch die entsprechenden Eigenschaften der wirksamen Verbindungen unterworfen sein könnten. Umfangreiche Untersuchungsreihen mit dem Ziel Beziehungen zwischen physikalisch - chemischen Eigenschaften von Arzneistoffen und ihrer Wirkung zu finden waren die Folge, wobei vor allem die Lokalanästhetika eine eingehende Bearbeitung erfuhren. J. B ü c h i und X. P e r l i a (1) gaben erst vor kurzem eine ausführliche Zusammenstellung des gegenwärtigen Standes auf diesem Gebiet.

Von großem Interesse war immer die Frage nach der Stabilität eines Lokalanästhetikums, da man annehmen konnte, daß z.B. Wirkungsdauer und Toxizität, abgesehen von möglichen resorptiven Beeinflussungen des Gewebes durch Spaltprodukte, eng mit ihrer Unversehrtheit verbunden seien. Besonders die Gruppe der Ester - Lokalanästhetika schien zur Beantwortung dieser Frage geeignet, da ihr Abbau im Organismus primär durch die Spaltung in Säure und Alkohol, einer relativ gut übersehbaren Reaktion, erfolgt und keines der Spaltprodukte auch nur annähernd so wirksam wie der intakte Ester ist (2-4). Von diesen Vorstellungen ausgehend bestimmten u.a. C. R o h m a n n und Mitarbeiter (5-14) neben einer Reihe physikalisch - chemischer Eigenschaften



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551903_0050

die alkalische Hydrolysengeschwindigkeit von etwa 200 von ihnen synthetisierten substituierten Benzoesäureestern. Die Verfolgung der enzymatischen Hydrolyse einiger Lokalanästhetika in vitro und vivo unter mannigfaltigsten Bedingungen und Gesichtspunkten - auch im Zusammenhang mit Konstitution und Wirkung - war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, auf die im Laufe dieser Arbeit noch hingewiesen wird.

Die Ergebnisse die die alkalische Hydrolyse betreffen, lassen deutlich erkennen, daß zwar innerhalb homologer Verbindungsreihen mitunter ein Zusammenhang zwischen Konstitution, Hydrolysengeschwindigkeit und pharmakologischer Wirkung besteht, von einer allgemeinen Gesetzmäßigkeit jedoch nicht gesprochen werden kann. Für die enzymatische Hydrolyse lassen sich in dieser Richtung aus verschiedenen Gründen noch keine bestimmten Aussagen machen. Einmal ist die Anzahl der untersuchten Verbindungen gering, zum anderen läßt die Heterogenität der eingesetzten Enzyme, Sera oder anderer Körperflüssigkeiten bzw. Gewebe keine exakten Vergleiche der bisher bekannten Ergebnisse zu.

In dieser Arbeit sollte deshalb an einigen gebräuchlichen Lokalanästhetika und einer von C. R o h m a n n und H. R i t s e r t (12) synthetisierten homologen Reihe von Alkoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthylestern der Einfluß der in den Benzolkern eingeführten Substituenten auf die enzymatische Spaltungsgeschwindigkeit untersucht und diese mit der hydroxylionenkatalysierten Hydrolyse und pharmakologischen Wirkung verglichen werden.

	Seite
2 <u>Allgemeiner Teil</u>	7
2.1 Enzymkatalysierte Esterhydrolyse	7
2.1.1 Die Aufklärung des esterspaltenden Prinzips	7
2.1.2 Die Kinetik der enzymkatalysierten Esterhydrolyse	10
2.2 Hydroxylionenkatalysierte Esterhydrolyse	13
2.2.1 Die Kinetik der hydroxylionenkatalysierten Esterhydrolyse	13

2 Allgemeiner Teil

2.1 Enzymkatalysierte Esterhydrolyse

2.1.1 Die Aufklärung des esterspaltenden Prinzips

Zu Beginn der Untersuchungen über die Wirkungsweise der L.A.)¹ im Organismus, verfolgte man vor allem den Weg, den die eingebrachte Substanz nahm und stellte dabei einen mehr oder weniger rasch eintretenden Wirkungsverlust fest (15). Die Frage war, ob eine rasche Ausscheidung des unzerstörten Esters, oder eine Esterspaltung für diese Beobachtung verantwortlich gemacht werden mußte. L. E e r l a n d und Mitarbeiter (16), die eine Abschwächung der Kokainwirkung durch Beigabe von Serum verschiedener Herkunft beobachteten, erklärten sich die Diskrepanz durch eine physikalische Adsorptionswirkung des Serums. Für den Abbau der Ester sprachen eine Reihe von Versuchen, die zeigten, daß nur ein geringer Teil der injizierten L.A. unzersetzt wieder ausgeschieden wurde (17,18). Den Nachweis für die Esterspaltung erbrachte M. H o t z (19) am Beispiel des Novokains. Entsprechend fanden andere Forscher (20) bei Kokain eines seiner Spaltprodukte, das Ekgonin. Seither ist der Beweis, daß die Ester - L.A. im Körper von Tier und Mensch einer Spaltung unterworfen sind, sehr oft erbracht worden (21-27).

Im Verlauf der Untersuchungen fiel auf, daß die "Entgiftung", d.h. der Abbau der L.A.hauptsächlich in der Leber erfolgte, denn im Vergleich zu anderen Organen war in ihr bei den meisten Säugetieren der geringste Anteil ungespaltener Ester nachzuweisen (18,23). Entsprechende Versuche mit Homogenaten, bzw. Extrakten aus Rattenleber (26), Meerschweinchen - Leber, -Niere, -Hirn, -Muskulatur (28) und Rinderleber (29), stimmten mit den Versuchen am lebenden Tier insofern überein, als auch mit den Leberpräpara-

)¹ L.A. = Lokalanästhetika

ten in vitro eine schnellere Spaltung erzielt wurde, als mit solchen der anderen Organe. Schließlich entdeckte man die Fähigkeit des Blutes Ester zu spalten (23) und ging auch hier zu in vitro - Versuchen über, indem man natives Blutserum (30-32), später auch die daraus isolierten, gereinigten Esterasepräparate verwendete (33-35).

D. G l i c k (36) sprach von der Wahrscheinlichkeit, daß diese Esterspaltungen durch Esterasen verursacht würden und bezweifelte die bis dahin geltende Anschauung, daß L.A. im Körper hauptsächlich einer Verseifung unterworfen seien. Vielleicht wurde die aus heutiger Sicht naheliegende Antwort deshalb erst so spät gefunden, weil die absolute Substratspezifität der Enzyme mit wenigen Ausnahmen als erwiesen galt. Mit Recht also, konnte man sich nicht vorstellen, daß für einfach gebaute synthetische Ester, ein im Körper vorgebildetes, spezifisches Enzym existiert. Ebenso war man überzeugt, daß diejenigen mit relativer Spezifität nur dem Abbau natürlich vorkommender Stoffe vorbehalten seien. Ein erster Beweis, daß für die Novokainspaltung in Diäthylaminoäthanol und PAB)¹ tatsächlich eine Esterase verantwortlich ist, stammt von J. W. L e g g e und E. B. D u r i e (37), die sie nach dem verwendeten Substrat, Novokain- bzw. Procainesterase nannten.

Bis zu dieser Zeit kannte man vor allem eine, im Blut, Plasma und in den Erythrocyten aufgefundene Esterase, die in der Lage war Acetylcholin zu spalten (38-39). E. S t e d m a n und Mitarbeiter (40) gaben ihr den Namen Cholinesterase. Bald darauf bestätigten L. H. E a s s o n und E. S t e d m a n (41) die Annahme vom Vorhandensein eines zweiten esterspaltenden Enzyms durch Versuche mit Pferdeblutserum und Meerschweinchenserum. Zum Unterschied zur Cholinesterase war es gegenüber Methylbutyrat aktiv. Die gleichen Autoren sprechen von einer dritten Esterase, die durch ihre Spezifität für Tributyrin charakterisiert

)¹ PAB = p-Aminobenzoesäure

sein soll. An Hand von Hydrolyseversuchen mit Phenolestern in menschlichem Blut, machen L. A. M o u n t e r und V. P. W h i t t a k e r (42) nicht weniger als fünf verschiedene Esterasen für ihren Abbau verantwortlich.

Die bis heute weitergeführten Versuche befassen sich in der Hauptsache mit der Identifizierung bisher aufgefundenener Esterasen, wobei die Beobachtung der Hemmwirkung, verursacht durch natürlich vorkommende oder synthetische Ester (43 - 48), oder deren unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeiten (49) Aufschluß geben können.

Vergleicht man die Ergebnisse einer umfangreichen Literatur über Esterasen, kommt man zu dem Schluß, daß prinzipiell zwischen zwei Cholinesterasen unterschieden werden kann. Dabei handelt es sich einmal um den Esterasetyp des Blutserums, der außer einer Anzahl komplizierter gebauter Ester auch einfachere, aliphatische spaltet, zum anderen um die Cholinesterase der Erythrocyten mit einer Spezifität für Cholinester. Gestützt auf einige Gemeinsamkeiten bezüglich der Beeinflussung durch gleiche Inhibitoren und bestimmte Leberkrankheiten, vermuteten R. H a z a r d und Mitarbeiter (50), daß Novokain- und Serumcholinesterase identisch seien. W. K a l o w (31) scheint den Beweis für diese Annahme erbracht zu haben. Ergänzend sei folgende Überlegung hinzugefügt. Untersuchungen über das Vorkommen der unspezifischen Serumcholinesterase im Blut verschiedener Warmblüter zeigten, daß sie unterschiedlich auf die Blutbestandteile verteilt ist. So enthalten z.B. bei Rind, Hammel und Ziege, die Blutkörperchen fast den gesamten Anteil dieser Esterase, während bei Mensch, Pferd, Hund, Katze und Ente sich der Hauptanteil im Blutserum befindet (51 -53). Bei Vorversuchen zu dieser Arbeit wurde die Hydrolyse des Novokains mit Rinder- und Pferdeserum beobachtet. Die Erwartung, daß Rinder- serum auf Grund der fehlenden Cholinesterase weit weniger aktiv sein dürfte als Pferdeserum, wurde erfüllt. Bei gleichen Versuchsbedingungen (Blut-pH und Körpertemperatur) trat mit ersterem in einem Zeitraum von 2 Stunden nur ein unbe-

deutender Verlust an Novokain ein, während in der gleichen Zeit Pferdeserum fast die Hälfte des eingesetzten Esters spaltete. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen von M. H. A v e n und Mitarbeitern (32), sowie anderer Autoren (54,55) bestätigt. Ihre Aktivitätsreihe der Sera verschiedener Tiere lautet folgendermaßen: Hammel = Rind = Ziege < Hund < Katze < Pferd.

Für die beiden Cholinesterasen finden sich in der Literatur unterschiedliche Namensgebungen, die der Übersicht wegen hier angegeben seien:

Cholinesterase I = spezifische Cholinesterase = wahre Cholinesterase = Acetylcholinesterase = Erythrocytenesterase.

Cholinesterase II = unspezifische Cholinesterase = Serumcholinesterase = Aliesterase = Pseudocholinesterase = Novokainesterase (Procainesterase) = Butyrylcholinesterase.

Für die hier durchgeführten Versuche hat vor allem die Butyrylcholinesterase Bedeutung, so genannt nach dem von ihr am schnellsten hydrolysierten Substrat, dem Butyrylcholin, das noch schneller als Novokain gespalten wird. Es gilt als gesichert, daß sie, mit Ausnahme vom Meerschweinchen, in der Leber gebildet wird (56,57). In diese Tatsache fügen sich auch die früher erwähnten Versuche mit Organextrakten ein, bei denen in der Leber stets der geringste Anteil an unzerstörtem Ester wiedergefunden und die Leber als "Entgiftungs-ort" für die L.A. angesehen wurde.

2.1.2 Die Kinetik der enzymkatalysierten Esterhydrolyse

Allgemein gelten für enzymkatalysierte Reaktionen dieselben Bedingungen wie für die allgemeine Katalyse. Im einfachsten Falle besteht die Gesamtreaktion aus zwei Teilreaktionen. Die erste führt zu einer Zwischenverbindung: Ausgangsstoff - Katalysator, die zweite ist der Zerfall der Zwischenverbindung in Katalysator und Endprodukt.

Diesem allgemeinen Schema entspricht in seiner einfachen

Form das Reaktionsschema von L. M i c h a e l i s und M. L. M e n t e n (58):



ROAc = Ester

E·ROAc = lose gebundener Zwischenkomplex zwischen Esterase und Ester

E = Esterase

k_1 , k_2 , k_3 sind die Teilgeschwindigkeiten der Reaktion.

L. Michaelis und M.L. Menten und vor ihnen A. J. B r o w n (59) und V. H e n r i (60), nahmen zur Erklärung ihrer Beobachtungen an, daß durch Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes die enzymkatalytische Wirkung erklärt werden kann, wobei die Gesamtgeschwindigkeit einer aus mehreren Teilreaktionen bestehenden Esterhydrolyse, ebenso wie die Reaktionsordnung, vom langsamsten Teilprozess bestimmt werden.

Da bei konstanter Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit (v) in erster Linie durch die Anzahl der Zusammenstöße (z) der Reaktionspartner pro Zeiteinheit (sec) bestimmt wird und z wiederum mit der Konzentration der Ausgangsstoffe proportional zunimmt, müßte v für verschiedene Konzentrationen auf einer Geraden liegen. Die Anfangsgeschwindigkeiten enzymkatalysierter Hydrolysen nehmen jedoch - bei zunehmender Substratkonzentration und konstanter Enzymkonzentration - nach Art einer Sättigungskurve zu und werden schließlich konzentrationsunabhängig (Abb. 11). Nach Anschauung obiger Autoren (58-60) ist der Zerfall der Enzym-Substrat-Zwischenverbindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Ihrer Natur nach ist sie ein Arrhenius'scher Zwischenstoff (61).

Der Kurvenverlauf zeigt, daß bei geringer Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit dieser proportional ist und bei weiterem Substratzusatz langsamer als die Konzentration ansteigt, bis sie schließlich einen Grenzwert

erreichen kann, der der Maximalgeschwindigkeit entspricht. (Vgl. diese Arbeit, Kapitel 3.3.3). Dies ist dann der Fall, wenn das gesamte Enzym zur Bildung des Zwischenstoffes verbraucht worden ist.

Sei $[T]$ die Konzentration des Gesamtzyms, $[S]$ die des Substrates, so gibt der Ausdruck:

$$[E] = [T] - [ES]$$

den Anteil des noch ungebunden vorliegenden Enzyms wieder (62). Ist die Substratkonzentration so hoch, daß sie durch Bildung von $[ES]$ nicht merklich abnimmt, erhält man nach dem M.W.G. die Gleichgewichtskonstante der Zwischenverbindung.

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([T] - [ES])[S]}{[ES]}$$

$$K_m = \left(\frac{[T]}{[ES]} - 1 \right) [S] ; [ES] = [T] \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Da die Anfangsgeschwindigkeit $v \sim [ES]$ ist, erhält man:

$$(2) \quad v = V \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} = V \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

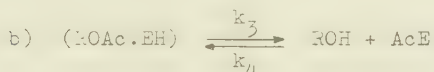
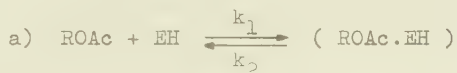
$$v = - \frac{d[S]}{dt} ; \quad \text{Aus Gleichung 2 erhält man für } K_m:$$

$$(3) \quad K_m = [S] \left(\frac{V}{v} - 1 \right).$$

K_m stellt eine für die Beziehung eines Enzyms zu einem bestimmten Substrat typische Größe dar. Sie wird gewöhnlich als Michaeliskonstante bezeichnet. Auf ihre Bedeutung soll im Laufe dieser Arbeit noch näher eingegangen werden. Streng genommen ist sie nicht mit der Gleichgewichtskonstanten der Zwischenverbindung identisch (vgl. 3.3.3.2). Es darf nicht

unerwähnt bleiben, daß verschiedene Autoren die volle Gültigkeit der Theorie von Michaelis und Menten in Frage stellen (63,64), andere dagegen bestätigen sie und erweiterten die ursprünglichen Vorstellungen (65). Im Prinzip besitzt sie auch für heutige Begriffe ausreichende Gültigkeit und diente deshalb als Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten enzymkatalysierten Reaktionen.

Berücksichtigt man die Erweiterungen der Theorie (66), könnte man den Ablauf der von Esterasen beeinflussten Esterhydrolyse z.B. nach folgendem Schema formulieren:
(In Anlehnung an H. N e t t e r (62)).



Danach verbindet sich das Enzym mit dem zu spaltenden Ester zu einem losen Zwischenkomplex (a). Dieser reagiert alkoholisch unter Abspaltung des Esteralkohols (b). Der durch Umesterung neuentstandene Ester zerfällt mit großer Geschwindigkeit hydrolytisch in seine Bestandteile - Säure und Esterase (c).

2.2 Hydroxylionenkatalysierte Esterhydrolyse

2.2.1 Die Kinetik der hydroxylionenkatalysierten Esterhydrolyse

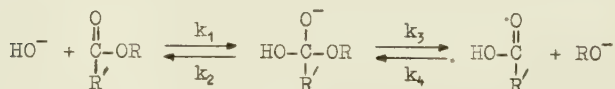
Die Esterhydrolyse kann nicht nur durch Enzyme katalysiert werden, sondern auch durch einfach gebaute anorganische Verbindungen, wie etwa durch Basen oder Säuren. Der Reaktionsmechanismus der hier interessierenden Spaltung durch Hydroxyl-

ionen ist relativ gut bekannt. Für die in dieser Arbeit verwendeten substituierten Benzoesäureester kämen theoretisch zwei Arten der Spaltung in Frage:



d.h. eine Acyl-Sauerstoffspaltung oder eine Alkyl-Sauerstoffspaltung. Durch die gewählten Versuchsbedingungen kann mit Sicherheit die letztere der beiden Möglichkeiten ausgeschlossen werden (67). Nach den Begriffen der allgemeinen Katalyse verläuft auch hier die Hydrolyse über die Bildung einer instabilen Zwischenverbindung, die durch Erniedrigung der Aktivierungsenergie ein Anwachsen der Reaktionsgeschwindigkeit bewirkt. Diese Zwischenverbindungen sind bis jetzt nur indirekt nachgewiesen (68), da ihre Zerfallsgeschwindigkeiten sowohl in die Ausgangsstoffe, als auch in die Endprodukte sehr groß sind. Durch Versuche von M. P o l a n y i und A. L. S z a b o (69), sowie F. A. L o n g und L. F r i e d m a n (70), ist außerdem die Acyl-Sauerstoffspaltung bei der alkalischen Hydrolyse als der weitaus häufigste Mechanismus bewiesen worden.

Ein von C. K. I n g o l d (67) zur Diskussion gestellter und von M. L. B e n d e r (68) bewiesener Reaktionsverlauf erfolgt bimolekular, im Sinne einer Carbonyladdition.



Die Zwischenverbindung zerfällt unter Abspaltung einer Alkoxygruppe RO^- und Abgabe eines Protons, das zur Säurebildung verbraucht wird. Der Zwischenstoff seinerseits wird durch Einlagerung des einsamen Elektronenpaares des Hydroxylions in die Oktetlücke des Carbonyl - C - Atoms gebildet. Während bis

hierher der Mechanismus als aufgeklärt gilt, ist der weitere Verlauf noch nicht vollständig gesichert. In diesem Zusammenhang erscheint ein kürzlich veröffentlichter Reaktionsmechanismus interessant (71).

Da die instabile Zwischenverbindung im Ingold'schen Mechanismus sehr rasch, sowohl zum Ester - durch Abspalten von OH^- - als auch in die Spaltprodukte - Abspaltung von RO^- - zerfallen kann, ist k_2 , sowie k_3 sehr klein im Vergleich zu k_1 und k_4 . In dieser bimolekularen Reaktion ist die Addition von OH^- an den Carbonylsauerstoff (k_1) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Darin besteht ein wesentlicher Unterschied zur enzymkatalysierten Hydrolyse, deren Geschwindigkeit von der Bildung der instabilen Zwischenverbindung Enzym - Ester bestimmt wird (72).

Die alkalische Esterhydrolyse ist prinzipiell umkehrbar, praktisch aber, durch die Protonenübertragung von der gebildeten Carboxylsäure auf das in der Lösung vorhandene Alkali, in ihrem Gleichgewicht völlig auf die Seite der Spaltung verlagert. Die Reaktionsgeschwindigkeit v wird deshalb definiert durch die Abnahme der Konzentration (c) der Reaktionspartner E bzw. OH^- .

$$v = - \frac{dc_E}{dt} . \text{ Andererseits ist } v \sim z \text{ und } z \sim c_E \cdot c_{\text{OH}^-}$$

setzt man die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion ein, erhält man:

$$v = k \cdot c_E \cdot c_{\text{OH}^-} . \text{ Im Falle des Vorliegens äquimolekularer Mengen ist: } c_E = c_{\text{OH}^-} . \text{ Es folgt: } v = k \cdot c^2 .$$

Die in dieser Arbeit durchgeführten Hydrolysen wurden jedoch mit einem sehr großen Laugenüberschuß durchgeführt, der so bemessen war, daß eine praktisch konstante Hydroxylionenkonzentration während des Reaktionsverlaufes angenommen wer-

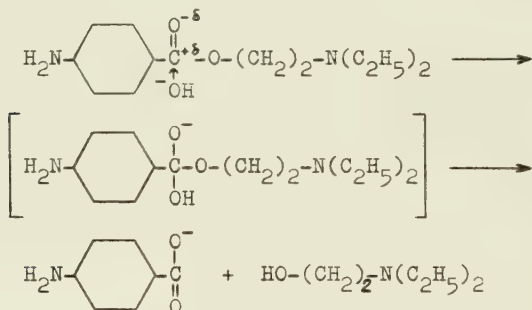
den konnte. Man kann also c_{OH^-} als Konstante in k mit einbeziehen und erhält für die Reaktionsgeschwindigkeit:

4

$$v = k' \cdot c_E$$

D.h. v ist allein von der Esterkonzentration abhängig. Unter diesen Bedingungen verhält sich die Hydrolyse der Ester trotz ihrer Bimolekularität wie eine Reaktion 1. Ordnung. Reaktionen dieser Art werden als pseudounimolekular bezeichnet (62,73).

Für das als Prototyp verwendete L.A. Novokain, kann bei den vorliegenden Versuchsbedingungen folgender Hydrolysenmechanismus angenommen werden.



Es bildet sich also β -Diäthylaminoäthanol und PAB, wobei letztere in dieser stark alkalischen Lösung als Anion vorliegt. T. Higuchi und Mitarbeiter (74), die die Kinetik der Novokainhydrolyse untersuchten, stellten fest, daß bei einem $\text{pH} > 9$ Novokain als freie Base vorliegt und daß die Hydrolyse bei jeder Temperatur und Hydroxylionenkonzentration als Reaktion 1. Ordnung abläuft.

	Seite
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	18
3.1 Zusammenstellung der untersuchten Lokalanästhetika	18
3.2 Die analytische Verfolgung der Esterhydrolyse	23
3.2.1 Allgemeines	23
3.3 Versuchsergebnisse	26
3.3.1 Charakterisierung der Absorptionsspektren	26
3.3.2 Diskussion der Absorptionsspektren	29
3.3.3 Ergebnisse der Messung der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit	51
3.3.3.1 Die Michaeliskonstanten	61
3.3.3.2 Diskussion der Versuchsergebnisse	63
3.3.4 Ergebnisse der Messung der alkalischen Hydrolysegeschwindigkeit	70
3.3.4.1 Die Hydrolysengeschwindigkeitskonstanten	78
3.3.4.2 Diskussion der Versuchsergebnisse	79
3.3.5 Enzymkatalysierte Hydrolyse und Absorptionsspektren	81
3.3.6 Enzymkatalysierte Hydrolyse und lokalanästhetische Wirkung	82

3 Allgemeiner Versuchsteil

3.1 Zusammenstellung der untersuchten Lokalanästhetika

Zu den Versuchen wurden zunächst solche Verbindungen herangezogen, die als L.A. Aufnahme in den Arzneischatz gefunden hatten. Im Rahmen der zur Verfügung stehenden Substanzen ist die Auswahl so getroffen, daß zwischen den einzelnen Verbindungstypen konstitutionelle Zusammenhänge bestehen. Außerdem wurde eine Reihe homologer Alkoxybenzoesäureester, die von C. R o h m a n n und H. R i t s e r t (12) synthetisiert wurden und ihrem Aufbau nach als L.A. anzusprechen sind, untersucht.

In Tabelle I sind die Substanzen nach Gruppen geordnet aufgeführt, beginnend mit einfachen Benzoesäureestern, bis zu mehrfach substituierten Alkaminbenzoesäureestern. Neben den Handelsnamen bzw. Verbindungsnummern, steht die chemische Bezeichnung.

Tabelle I

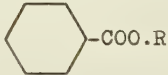
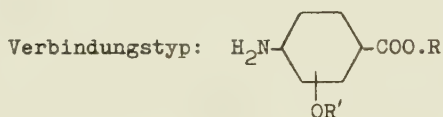
Lfd. Nr.	Handelsnamen	Chemische Bezeichnung
		Verbindungstyp: 
1	Metycaine	Benzoessäure- γ -(2-methylpiperidino)-n-propylester-hydrochlorid
2	Stovaine	Benzoessäure- α -methyl- α -äthyl- β -dimethylaminoäthylester-hydrochlorid
3	Cyclaine	Benzoessäure- β -cyclohexylamino- α -methyl-äthylester-hydrochlorid

Tabelle I (Fortsetzung)

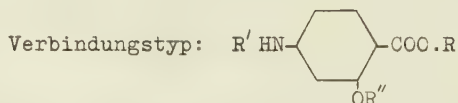
Lfd. Nr.	Handelsnamen	Chemische Bezeichnung
Verbindungstyp: $\text{R}^1 \text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10} - \text{COO} \cdot \text{R}$		
4	Stadacain	4-n-Butoxybenzoesäure-β-diäthyl-aminoäthylester-hydrochlorid
5	Intracaine	4-Äthoxybenzoesäure-β-diäthyl-aminoäthylester-hydrochlorid
6	Surfacaine	4-Cyclohexyloxybenzoesäure-γ-(2-methylpiperidino)-n-propylester-hydrochlorid
Verbindungstyp: $\text{H}_2\text{N} - \text{C}_6\text{H}_{10} - \text{COO} \cdot \text{R}$		
7	Novokain	4-Aminobenzoesäure-β-diäthyl-aminoäthylester-hydrochlorid
8	Butacaine	4-Aminobenzoesäure-γ-dibutyl-amino-n-propylester-sulfat
9	Tutocain	4-Aminobenzoesäure-γ-dimethylamino-α-methyl-β-methyl-n-propylester-hydrochlorid
10	Larocain	4-Aminobenzoesäure-γ-diäthylamino-β,β'-dimethyl-n-propylester-hydrochlorid
Verbindungstyp: $\text{R}^1 \text{HN} - \text{C}_6\text{H}_{10} - \text{COO} \cdot \text{R}$		
11	Cornecain	4-n-Propylaminobenzoesäure-γ-dimethylamino-β-hydroxy-n-propylester-hydrochlorid

Tabelle I (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Handelsnamen	Chemische Bezeichnung
12	Pantocain	4-n-Butylaminobenzoesäure-β-dimethylaminoäthylester-hydrochlorid



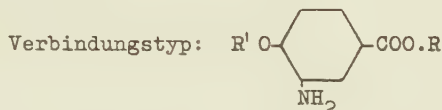
13	Propoxycaine	2-n-Propoxy-4-aminobenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
14	Oxyprocain	2-Oxy-4-aminobenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
15	Sympocaine	2-n-Butoxy-4-aminobenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
16	Novesin	3-n-Butoxy-4-aminobenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid



17	Salicain	2-Oxy-4-n-Butylaminobenzoesäure-β-dimethylaminoäthylester-hydrochlorid
18	Gynodal	2-Äthoxy-4-n-butylaminobenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid

Tabelle I (Fortsetzung)

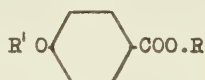
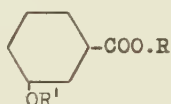
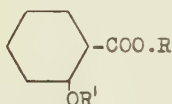
Lfd. Nr.	Handelsname	Chemische Bezeichnung
----------	-------------	-----------------------



19	Ophthaine	3-Amino-4-n-propoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
----	-----------	--

Lfd. Nr.	Verb. Nr.	Chemische Bezeichnung
----------	-----------	-----------------------

Alkoxybenzoesäureester der folgenden Verbindungstypen:



20	o - I	2-Methoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
21	o - II	2-Äthoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
22	o - III	2-n-Propoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
23	o - IV	2-n-Butoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
24	o - V	2-i-Propoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
25	m - I	3-Methoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
26	m - II	3-Äthoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
27	m - III	3-n-Propoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
28	m - IV	3-n-Butoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid
29	m - V	3-i-Propoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester-hydrochlorid

Tabelle I (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Verb. Nr.	Chemische Bezeichnung
30	p - I	4-Methoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthyl- ester-hydrochlorid
31	p - II	4-Äthoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthyl- ester-hydrochlorid
32	p - III	4-n-Propoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthyl- ester-hydrochlorid
33	p - IV	4-n-Butoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthyl- ester-hydrochlorid
34	p - V	4-i-Propoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthyl- ester-hydrochlorid
35	p - VI	4-i-Butoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthyl- ester-hydrochlorid

Den Firmen: Abbott Laboratories, Chemiewerke Homburg A.G., Farbwerke Hoechst A.G., Eli Lilly International Corp., Merck, Sharp and Dohme International, Olin Mathieson Chemical Corp., Specia und Stearling - Winthrop Research Institute sei an dieser Stelle nochmals für die freundliche Überlassung einiger ihrer Präparate vielmals gedankt.

3.2 Die analytische Verfolgung der Esterhydrolyse

3.2.1 Allgemeines

Die Beobachtung der enzym- und hydroxylionenkatalysierten Esterhydrolyse kann prinzipiell durch die quantitative Bestimmung des Esters und seiner Spaltprodukte erfolgen. Gerade für die Ester-L.A. wurden zahlreiche Untersuchungsverfahren entwickelt, die z.T. von verschiedenen Fragestellungen ausgegangen waren. Z.B. Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Esterspaltung, Prüfung der Stabilität in wässrigen Lösungen und Verfolgung enzymatischer Vorgänge in vivo und vitro. Aus der Vielzahl der Versuche seien die wichtigsten Methoden genannt.

a) Kolorimetrische Verfahren

L.A. mit einer primären, kernständigen Aminogruppe lassen sich diazotieren und mit geeigneten Reagenzien zu Farbstoffen kuppeln. Auf Grund des Bouguer-Lambert-Beer'schen Gesetzes kann an Hand der Intensität einer entstandenen Färbung die Konzentration der betreffenden Verbindung bestimmt werden. Dazu müssen entweder die Spaltprodukte oder der noch vorhandene Ester aus dem Gemisch isoliert werden. Diese Trennung geschieht entweder vor der Diazotierung, oder nach Bildung des Farbstoffes vor allem nach zwei Verfahren:

1) Auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit, durch Ausschütteln mit geeigneten Lösungsmitteln (75-78).

2) Auf chromatografischem Wege (79-86).

Als Kupplungsreagenzien nach der Diazotierung der Aminogruppe werden verwendet:

α -Naphthylamin

(76), K. H. B o l t z e und Mitarbeiter (77) verwendeten

außerdem: Äthyl-naphthylamin, 1-Naphthylamin-4-sulfonsäure, 2-Naphthylamin-5,7-disulfonsäure, 1-Naphthylamin-3,6-disulfonsäure, Tetrabrom -m-kresol-sulfophthalein.

α -Naphthol (79,81,84).

β -Naphthol (80,87-89).

Thymol (78,90-94).

N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid = NED (95-102).

N-(1-Naphthyl)-N -diäthyl-propylendiamin. (75).

1-Sulfomethylamino-naphthalin-8-sulfosäure (103,104).

Kaliumsulfaguajacolicum (23,105).

4-Aminomethylbenzaldehyd (106).

1,2,-Naphthochinon-4-sulfosaures Na (107-109).

Eine Diazotierung kann umgangen werden durch Bildung der Reineckate und deren kolorimetrische Bestimmung (110-112), sowie durch Kondensation mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd (83,113,114).

A. H ä u B l e r (115) gibt eine Mikrobestimmung für verschiedene L.A. an, bei der mit Tropäolin oo die Bildung eines stabilen Farbstoffkomplexes z.B. auch beim Stadacain erreicht wird.

Für die Bestimmung von Novokain in Cerebrospinalflüssigkeit verwendeten H. K o s t e r und Mitarbeiter (116) V a n i l - l i n . A. S a und Mitarbeiter (117) fanden, daß Novokain mit Na-Cu-Bromid eine zur Kolorimetrierung geeignete Färbung gibt.

Zur Entwicklung der Papierchromatogramme dienen vornehmlich *Dragendorffs* Reagens (80,82,85,86) und nitrose Gase (83).

b) Gravimetrische Bestimmung

E. Schulek und Mitarbeiter (118, 119) führten diese Methode z.B. an PAB-Estern durch.

c) Maßanalytische Bestimmung

C. und U. Rohmann (120) ermittelten durch Verdrängungstitration mit NaOH den Zersetzungsgrad von Novokain, Pantocain, Stovaine, Panthesin, Tutocain, β -Eucain und Larocain beim Sterilisieren.

Außerdem wurden Methoden zur acidimetrischen, alkalimetrischen, jodometrischen und bromometrischen Titration ausgearbeitet (121-127).

d) Potentiometrische Bestimmung (123).

e) Gasvolumetrische Bestimmung

Sie ermöglicht die indirekte Verfolgung der Spaltung von L.A. in Serum (126).

f) Photonephelometrische Bestimmung (113).

g) UV-Spektrofotometrische Bestimmung

Eine neuere Methode der physikalischen Chemie, die im Laufe der letzten zwanzig Jahre eine immer größere Bedeutung für die analytische Verfolgung enzymatischer Vorgänge erlangt hat. Sie ist grundsätzlich immer dann anwendbar, wenn die zu untersuchende Substanz eine Absorption im ultravioletten Bereich des Spektrums aufweist. Über die Tatsache, daß eine Spektralverschiebung einer Zersetzung von Estern zuzuschreiben ist, berichtete schon *R. Dietz* (129). Weitere

Arbeiten ließen erkennen, daß die UV-Spektrofotometrie geeignet war verschiedene L.A. sowie ihre Spaltprodukte in einer Lösung nebeneinander zu bestimmen (130-134). Auf Grund orientierender Versuche erschien diese Methode am besten geeignet, die in dieser Arbeit gestellten Fragen zu beantworten.

Gegenüber den unter a) bis f) aufgeführten Methoden bietet sie folgende Vorteile:

Die Messung kann kontinuierlich und lückenlos den gesamten Verlauf einer Esterhydrolyse, ohne Zusatz weiterer Reagenzien als der im Reaktionsgemisch vorhandenen, mit einer geringen Substanzmenge durchgeführt werden. Wesentliche Voraussetzung dazu war eine Charakterisierung der Spektren der Ester und ihrer Spaltprodukte.

3.3 V Versuchsergebnisse

3.3.1 Charakterisierung der Absorptionsspektren

In Tabelle II sind die experimentell bestimmten Daten der charakteristischen Punkte der Absorptionskurven der in Tabelle I aufgeführten Verbindungen, nämlich Maxima, Minima und "Schultern" zusammengefaßt.

Tabelle II

Lfd. Nr.	Verbindung	2. Hauptbande				1. Hauptbande				Nebenbande			
		Maximum		Minimum		Maximum		Minimum		2. Maximum		Minimum	
		λ (mp)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
1	Metycaine					232,0	12,15			275,0	0,80	290,0	0,05
2	Stovaine					233,0	12,80			275,0	1,10	295,0	0,15
3	Cyclaine					232,5	13,05			275,0	1,25	295,0	0,15
4	Stadacain			247,5	2,10	261,0	18,00						
5	Intracaine			227,5	2,00	260,5	17,65						
6	Surfacaine			217,5	2,00	251,5	17,40						
7	Novokain	222,0	7,40	241,5	0,70	290,0	16,65						
8	Butacaine	220,6	8,40	241,0	1,35	288,0	17,15						
9	Tutocain	220,0	8,80	240,5	1,85	288,5	18,05						
10	Larocain	221,0	7,95	241,0	1,40	289,0	17,80						
11	Corneccain	226,0	6,80	248,0	0,90	308,5	21,60						
12	Pantocain	229,0	5,90	248,5	0,70	311,5	21,90						
13	Propoxyccaine			223,5	9,10	233,0	11,45	252,5	4,95	279,0	14,50	288,0	13,75
14	Oxyprocain			223,5	5,00	233,5	7,30	248,5	3,70	278,5	13,70	287,5	13,55
15	Sympocaine			224,0	8,90	233,5	11,15	252,5	4,65	278,5	13,80	288,5	13,15
16	Novesin			218,0	7,60	231,5	12,10	252,0	2,10	285,0	9,50 ⁺		307,0
17	Salicain			225,0	3,70	244,0	7,50	262,5	3,30	290,0	13,20 ⁺		315,0
18	Gynodal			226,5	5,10	242,0	8,35	261,5	3,50	295,0	13,80 ⁺		314,0
19	Ophthaine	231,5	24,60	251,5	5,95	267,5	9,50	288,5	3,10	310,0	5,30		21,65

⁺ = Schulter

Tabelle II (Fortsetzung)

Lfd. Nr.	Verbindung	2. Hauptbande				1. Hauptbande				Nebenbande			
		Maximum		Minimum		Maximum		Minimum		Maximum		Minimum	
		λ (mp)	$\text{\AA} \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\text{\AA} \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\text{\AA} \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\text{\AA} \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\text{\AA} \cdot 10^{-3}$	λ (mp)	$\text{\AA} \cdot 10^{-3}$
20	o - I			221,0	3,10	238,0	6,90	265,0	0,05	299,0	2,70	321,0	0,05
21	o - II			222,0	4,35	238,0	7,45	265,0	0,05	298,0	3,25	330,0	0,10
22	o - III			223,3	4,75	238,0	7,35	264,0	0,05	298,0	3,40	330,0	0,10
23	o - IV			223,0	4,75	238,0	7,25	262,0	0,30	298,0	3,35		
24	o - V			223,0	4,80	238,5	7,50	265,0	0,15	298,5	3,40		
25	m - I			228,0	5,80	239,5	7,15	265,0	0,60	296,5	2,50	330,0	0,20
26	m - II			228,3	5,80	239,0	7,25	265,0	0,10	298,5	2,25	330,0	0,10
27	m - III			228,0	5,95	239,5	7,25	265,0	0,20	298,5	2,35	330,0	0,10
28	m - IV			228,5	6,30	239,0	7,45	266,0	0,35	299,0	2,45	330,0	0,20
29	m - V			228,3	6,50	239,0	7,65	265,0	0,35	299,0	2,25		
30	p - I			227,0	1,70	260,0	17,00	300,0	0,10				
31	p - II			227,5	1,90	260,5	17,65	305,0	0,15				
32	p - III			227,5	1,95	261,0	17,75	305,0	0,15				
33	p - IV			227,5	1,85	261,5	17,90	304,0	0,05				
34	p - V			228,5	2,25	261,5	17,80	305,0	0,15				
35	p - VI			228,0	2,20	261,5	18,10	305,0	0,15				

3.3.2 Diskussion der Absorptionsspektren

Die Hauptabsorption der hier untersuchten Verbindungen wird im wesentlichen durch das aromatische System bestimmt, deshalb sind ihre Spektren so diskutiert, daß die Einflüsse der verschiedenen Substituenten auf die Π -Elektronen des Benzolrings und die dadurch bedingten Veränderungen des Benzolspektrums betrachtet werden.

Das Absorptionsspektrum des Benzols ist im UV-Gebiet durch drei Bandensysteme gekennzeichnet, die sich in ihrer Intensität und Struktur unterscheiden. Eine Bande geringer Intensität bei 256 m μ wird als Nebenbande oder α -Bande, eine Bande hoher Intensität bei 200 m μ als 1. Hauptbande oder p-Bande und eine Bande sehr hoher Intensität bei 180 m μ als 2. Hauptbande bezeichnet (135,136). Die kurzwellige Absorption des stabilen mesomeren Systems der sechs konjugierten, ringförmig angeordneten Π -Elektronen wird bei Einführung von Substituenten in der Regel mehr oder weniger bathochrom verschoben (142).

Die in Tabelle I genannten Verbindungen weisen folgende Substituenten auf: Carboxyl-, Amino-, Hydroxyl- und Alkoxygruppen. Nach ihren Fähigkeiten Elektronen in den Benzolkern abzugeben oder aus diesem aufzunehmen, ordnen sie sich in der steigenden Reihenfolge ihrer rotverschiebenden Wirkung in folgende Reihen ein:

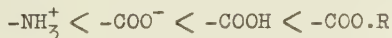
1) Elektronendonatoren, Auxochrome oder Substituenten

1. Ordnung:



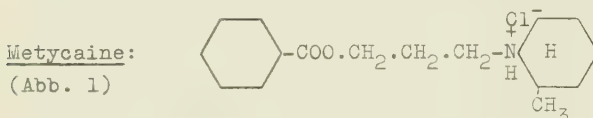
2) Elektronenacceptoren, Antiauxochrome oder Substituenten

2. Ordnung:



Im folgenden werden unter Zugrundelegung der Tabelle I

die Spektren der L.A. besprochen, sowie die aus ihnen entstehenden Spaltprodukte vergleichend betrachtet.



Spaltprodukte: Benzoation und 2-Methylpiperidino-n-propanol.

Die Untersuchungen ergaben, daß die Benzoesäure nach der Esterspaltung nicht nur in relativ stark alkalischer Lösung (74), sondern auch in phosphatgepufferter Lösung von einem pH 7,35, bei dem die enzymatische Hydrolyse durchgeführt wurde, als Anion vorliegen muß. Betrachtet man die Maxima der verschiedenen Benzoesäurespektren ergeben sich folgende Werte:

Benzoessäure bzw. Benzoation	Maxima			
	Nebenbande		1. Hauptbande	
	$\lambda(\text{m}\mu)$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$\lambda(\text{m}\mu)$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
Anion in wässriger Lösung	270	0,60	225	8,40
aus Metycaine durch Hydrolyse entstanden	270	0,60	225	8,55
Anion in wässriger Lösung) ¹	268	0,56	224	8,70
undissoziierte Benzoessäure) ²	273	0,97	230	11,60

)¹ und)² Diese Werte wurden der Tabelle von L. D o u b und J. M. V a n d e n b e l t (137) entnommen.

Die gefundenen Werte für das Benzoation stimmen mit den Literaturwerten bezüglich der Bandenlage gut überein und unterscheiden sich deutlich von denen der undissoziierten Benzoesäure durch die Verschiebung der Absorptionskurve beim Anion in den Bereich des kürzeren UV und die Intensitätserniedrigung der Banden.

Daß dies zu erwarten ist, ergibt sich aus folgender Betrachtung:

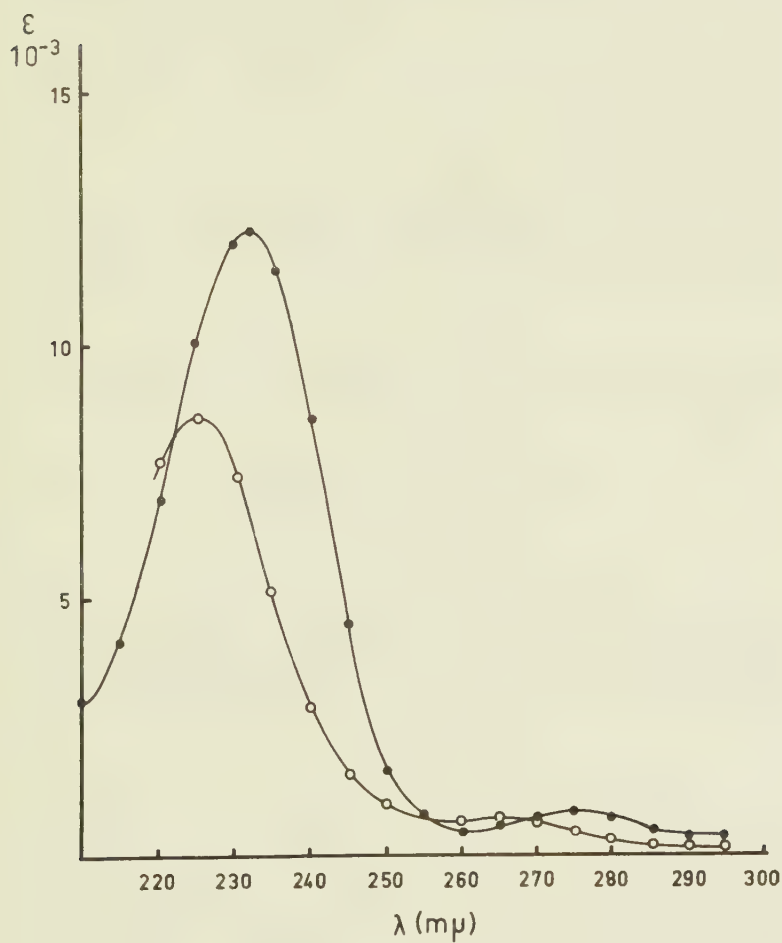


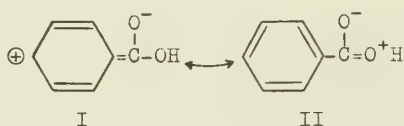
Abb. 1

●●● Metycaine

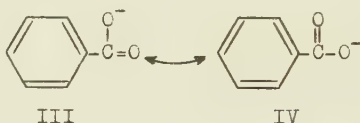
ooo Benzoation

tung. Beide Substituenten $-\text{COOH}$ und $-\text{COO}^-$ gehören zu den Elektronenacceptoren, jedoch ist auf Grund unterschiedlicher Mesomerieverhältnisse ihre Fähigkeit Elektronen aus dem Benzolkern aufzunehmen, verschieden groß.

In I und II seien zwei Mesomeriemöglichkeiten der undissoziierten Säure wiedergegeben.



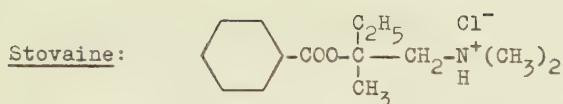
Beim Übergang zum Anion tritt zu ihnen eine begünstigte Mesomerie innerhalb des Carboxylations (III und IV)



in Konkurrenz, die einer Elektronenabgabe aus dem Ring entgegenwirkt (138). $-\text{COO}^-$ ist deshalb ein schwächeres Antiauxochrom als $-\text{COOH}$ und bewirkt die experimentell festgestellten Veränderungen im Benzoessäurespektrum.

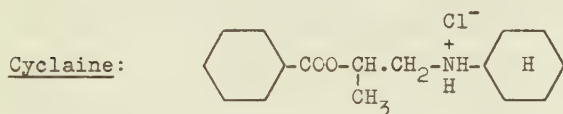
Der Piperidinring des Alkohols absorbiert wie ein sekundäres Amin (139) und überlagert sich deshalb nicht mit dem Spektrum der Säure. Theoretisch müßte der in wässriger Lösung stabile Ester angenähert die Absorptionskurve der undissoziierten Benzoessäure besitzen. Das experimentelle Ergebnis bestätigt diese Annahme.

	1. Hauptbande		Nebenbande	
	$\lambda(\text{m}\mu)$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$\lambda(\text{m}\mu)$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
Metycaine	232,0	12,2	273,5	0,85
Benzoessäure) ¹	230,0	11,6	273,0	0,97
¹ Lit. Stelle (137)				



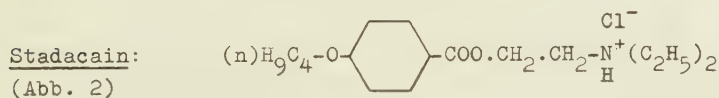
Spaltprodukte: Benzoation und α -Methyl- α -äthyl- γ -dimethylaminoäthanol.

Die für Metycaine gemachten Aussagen gelten auch für Stovaine. Die Vergleichswerte finden sich in Tab. II. Gegenüber dem Metycaine-Spektrum erfolgt außer einer geringen Rotverschiebung eine ebenfalls geringe Intensitätserhöhung.



Spaltprodukte: Benzoation und β -Cyclohexylamino- α -methyläthanol.

Da vollständig aushydrierte Ringsysteme sich wie die entsprechenden aliphatischen Verbindungen verhalten (136), zeigt der Cyclohexanring in dem gemessenen Spektralbereich keine Absorption. Das Spektrum des Cyclaines muß also ebenfalls dem der oben besprochenen Verbindungen ähnlich sein. (Vgl. Tab. II, lfd. Nr. 1 - 3).



Spaltprodukte: 4-n-Butoxybenzoation und γ -Diäthylaminoäthanol.

Durch die Einführung der elektronenabgebenden Butoxygruppe ist in der 4-n-Butoxybenzoesäure ein Auxochrom mit einem Antiauxochrom über das mesomere System des Benzolrings verbunden.

Allgemein werden durch die Einführung eines Substituenten

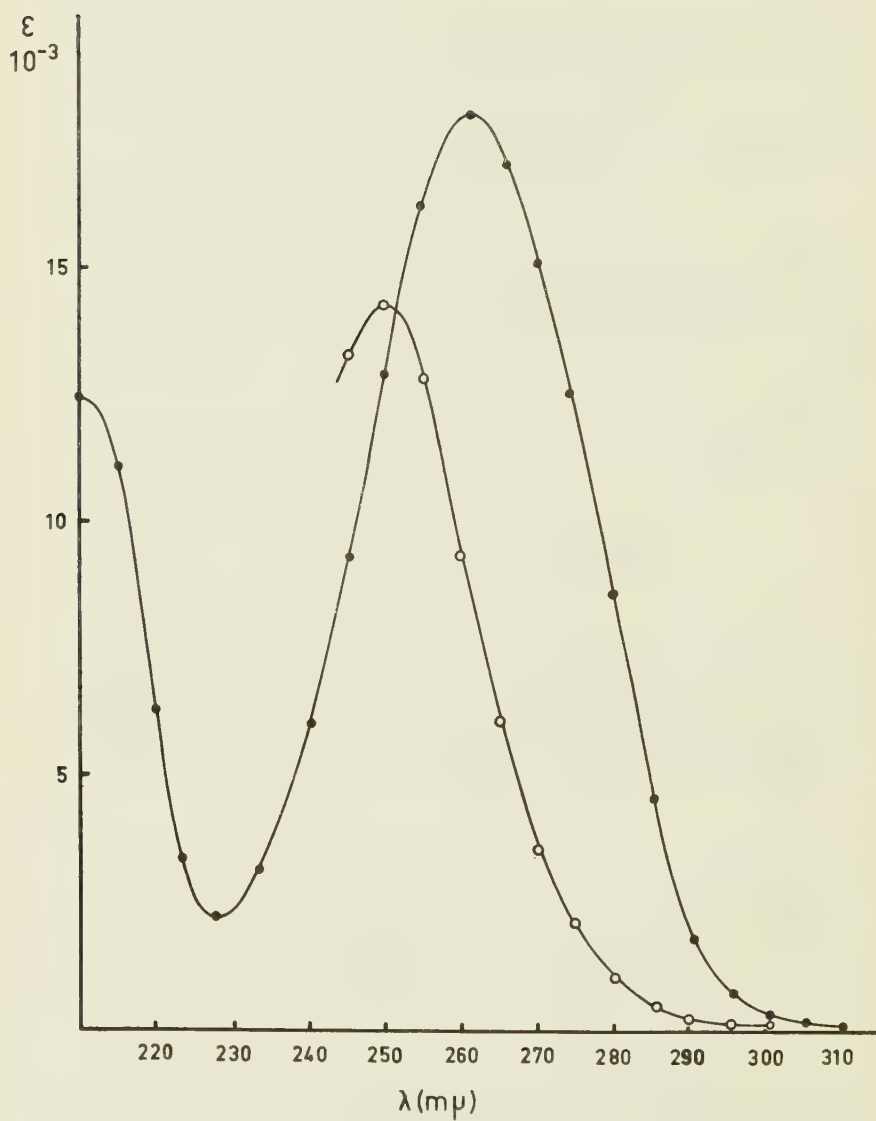
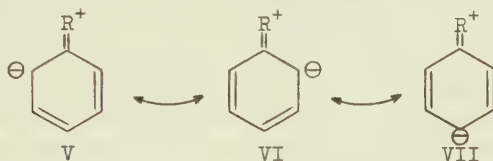


Abb. 2

●●● Stadacain

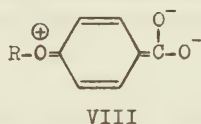
ooo 4-n-Butoxybenzoation

am Benzolkern die polaren Strukturen (z.B. V - VII) begünstigt.



Dies führt zu einer Ausbildung elektrischer Momente senkrecht zur Bindungsrichtung, die durch Überlagerung der polaren Strukturen des Rings mit den nicht angeregten Kekulé-Strukturen zustandekommen. Die Nebenbande, die annäherungsweise diesem Vorgang zugeordnet werden kann, erfährt durch die Begünstigung dieser Momente eine Rotverschiebung (140). Tritt ein weiterer, jedoch ungleichnamiger Substituent in 4-Stellung an den Benzolkern, findet eine vektorielle Subtraktion der elektrischen Momente statt. Daher ist bei der Einführung der Butoxygruppe, wie im Falle Stadacain mit einer Blauverschiebung dieser Bande gegenüber ihrer Lage in der Benzoessäure zu rechnen.

Durch die p-Substitution am Benzolring mit Substituenten verschiedener Ordnung wird aber eine chinoide polare Grenzstruktur entsprechend VIII begünstigt werden, wobei ein



Elektronenübergang in Richtung der Bindung der Substituenten stattfindet, der für die erste Hauptbande verantwortlich gemacht wird. Da sich in diesem Fall die Einzelverschiebungen mehr summieren als der algebraischen Summe entspricht (141), tritt eine Rotverschiebung und Intensitätserhöhung dieser Bande ein. Das UV-Spektrum des 4-n-Butoxybenzoations (Abb. 2) kann man im Vergleich zu dem des Benzoations so deuten, daß eine Überlagerung der, aus den oben genannten Gründen, hypsochrom verschobenen, in ihrer Intensität geschwächten Nebenbande, durch die um 23 mμ batho-

chrom verschobene, in ihrer Intensität erhöhten 1. Hauptbande, eingetreten ist. Ähnliche Beobachtungen bei der Einführung von Methoxy- und Äthoxygruppen in 4-Stellung des Benzolrings machten auch K. L. W o l f und W. H e r o l d (142). Das aus Stadacain bei der enzymatischen Hydrolyse erhaltene Säureanion entspricht in seinem Wert für das Maximum der 1. Hauptbande annähernd dem Methoxyhomologen.

	1. Hauptbande	
	$\lambda(\text{m}\mu)$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
4-Methoxybenzoat- ion) ¹	247,0	14,00
4-n-Butoxybenzoat- ion	250,0	14,25
) ¹ Lit. St. (137)		

Durch die Veresterung der Carboxylgruppe zum Stadacain, verschwindet die Mesomerie des freien Ions. Dadurch wird die Delokalisation der π -Elektronen innerhalb des Benzolrings erleichtert, die dafür aufzuwendende Energie also geringer, was gleichbedeutend mit einer weiteren bathochromen Verschiebung gegenüber dem 4-n-Butoxybenzoation ist. (Abb. 2).

Derartige Änderungen der Resonanzverhältnisse durch Einführung von Substituenten, werden von W. D. K u m l e r und L. A. S t r a i t (138) für entscheidender in ihrem Einfluß auf das Absorptionsspektrum angesehen, als der "weighting effect" der Molekülvergrößerung. Das durch die Veresterung miteingeführte tertiäre Amin $-N(C_2H_5)_2$, das den Charakter eines Auxochroms hat, dürfte durch seine Isolierung von der Carboxylgruppe durch ausschließlich σ -Elektronen aufweisende $-CH_2$ -Gruppen, keinen großen Einfluß auf das Gesamtspektrum haben.

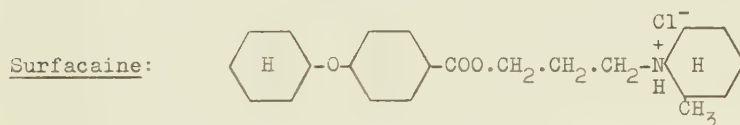
Die Verschiebung des Stadacainspektrums gegenüber den bisher besprochenen Verbindungen ist so groß, daß die 2. Hauptbande in den meßbaren Bereich tritt. Ihr Maximum liegt un-

gefähr bei 206 mp.



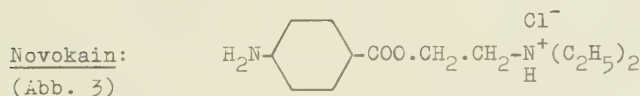
Spaltprodukte: 4-Äthoxybenzoesäure und β-Diäthylamino-
äthanol.

Im Vergleich zum Stadacain ist die strukturelle Veränderung nur geringfügig. Außer der zu erwartenden minimalen hypsochromen Verschiebung und Intensitätserniedrigung der 1. Hauptbande, sind die Spektren beinahe identisch. (Vgl. Tab. II, lfd. Nr. 4 - 5).



Spaltprodukte: 4-Cyclohexyloxybenzoesäure und γ-(2-Methylpiperidino)-n-propanol.

Da aushydrierte Ringe, wie schon bei Cyclaine erwähnt, im aufgenommenen Spektralbereich optisch durchlässig sind, erhält man für das Säureanion erwartungsgemäß ein den besprochenen Alkoxybenzoesäuren analoges und für den Ester ein dem Intracaine und Stadacain ähnliches Spektrum. (Tab. II).



Spaltprodukte: 4-Aminobenzoäure und β-Diäthylamino-
äthanol.

Das Spektrum des PAB-Anions ist stark beeinflusst von der kernständigen Aminogruppe. Wie die Alkoxygruppen gehört sie zu den Elektronendonatoren. In der PAB stehen sich also wieder Auxochrom und Antiauxochrom gegenüber.

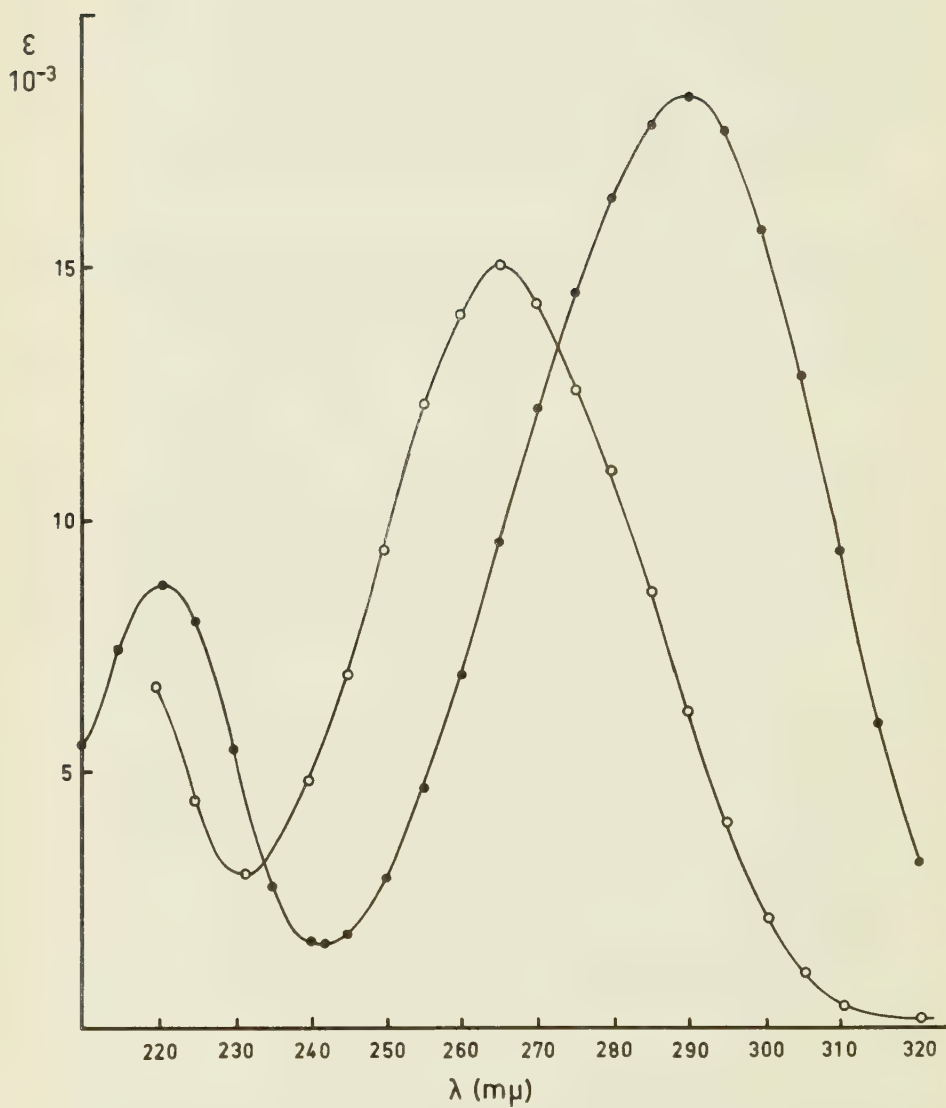
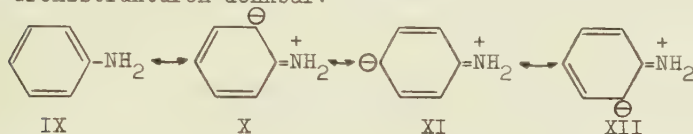


Abb. 3

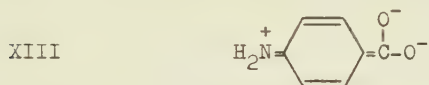
●●● Novokain

ooo 4-Aminobenzoat

Ist die Aminogruppe einziger Substituent, sind folgende Grenzstrukturen denkbar:



Durch die Einführung der -COO^- -Gruppe in 4-Stellung wird von diesen Grenzstruktur XIII begünstigt sein (138).



Die Einzelverschiebungen des Auxochroms und Antiauxochroms addieren sich in Bezug auf die 1. Hauptbande (vgl. Seite 35), so daß die beim Anilin noch vorhandene Nebenbande bei 280 μ durch die Rotverschiebung des PAB-Spektrums, von der 1. Hauptbande überlagert wird.

	1. Hauptbande	
	$\lambda(\mu\mu)$	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
Anilin) ¹	230,0	8,6
PAB-Anion) ²	265,0	15,0
PAB-Anion) ³	265,0	14,7

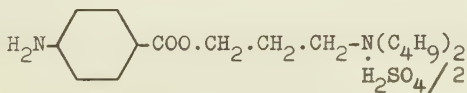
)¹ Lit. St. (137)

)² aus Novokain durch Hydrolyse mit Serum erhalten.

)³ aus Novokain durch Hydrolyse mit NaOH erhalten.

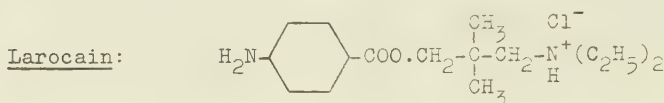
Im ungespaltenen Novokain wird die negative Ladung des Anions vom Alkoholrest beansprucht. Aus den auf Seite 35 angegebenen Gründen (Summierung der Einzelverschiebungen) ist also eine Rotverschiebung und Intensitätserhöhung der 1. Hauptbande zu erwarten.

Butacaine:



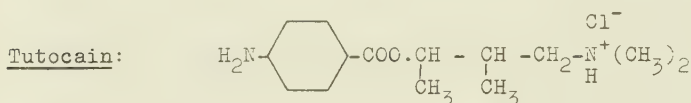
Spaltprodukte: 4-Aminobenzoation und γ -Dibutylamino-n-propanol.

Die Molekülvergrößerung gegenüber Novokain macht sich nur unbedeutend bemerkbar, die Spektren beider Ester sind sich sehr ähnlich. (Vgl. Tab. II, lfd. Nr. 7 - 8).



Spaltprodukte: 4-Aminobenzoation und γ -Diäthylamino- β , β' -dimethyl-n-propanol.

Wie aus Tabelle II ersichtlich, unterscheidet sich das Spektrum nur unwesentlich von dem des Novokains.



Spaltprodukte: 4-Aminobenzoation und γ -Dimethylamino- α -methyl, β -methyl-n-propanol.

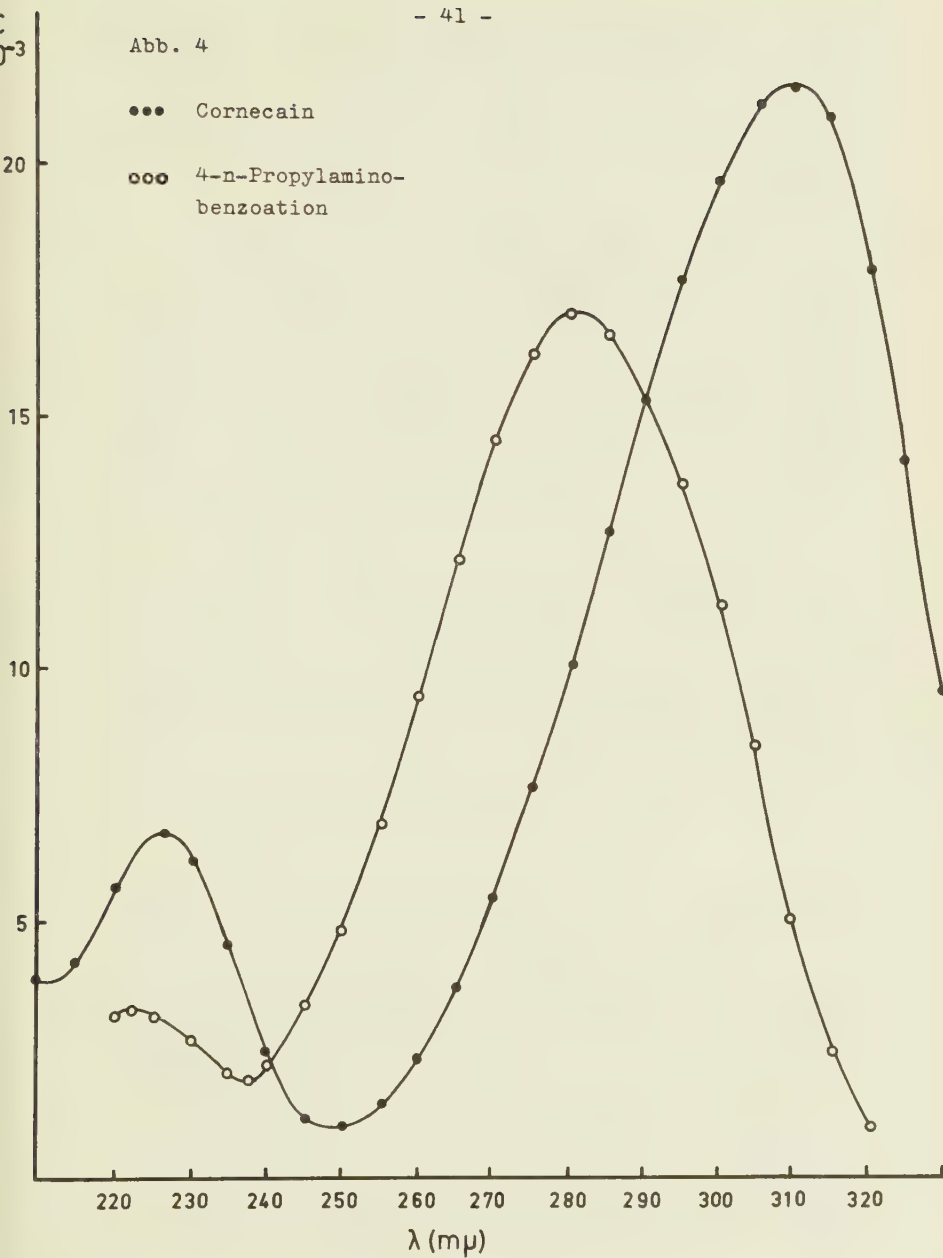
Auch hier ist die Absorptionskurve gleichlaufend mit der des Novokains und unterscheidet sich nur geringfügig in der Intensität.

Die auffallende Übereinstimmung der UV-Spektren der in dieser Arbeit genannten 4-Aminobenzoessäureester zeigt, daß die Beeinflussung der Π -Elektronenwolke des Benzols, der die Absorption in der Hauptsache zuzuschreiben ist, durch geringfügige Änderung der Kettenlänge und Verzweigung im Alkoholrest nur gering sein kann.

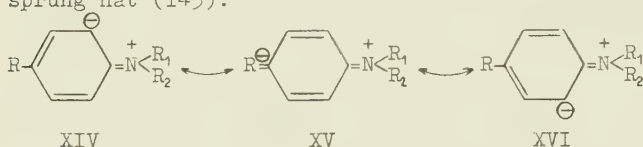


Spaltprodukte: 4-n-Propylaminobenzoation und γ -Dimethylamino- β -hydroxy-n-propanol.

Abb. 4



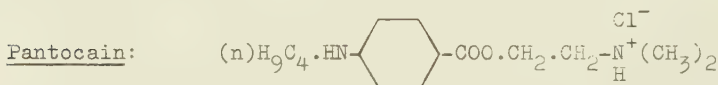
Durch die Alkylierung der primären aromatischen Aminogruppe der PAB erfolgt eine beträchtliche Rotverschiebung des Spektrums, die in der erhöhten Polarität der sekundären Aminogruppe, d.h. einem gegenüber der PAB erhöhten Anteil der polaren Grenzstrukturen (z.B. XIV, XV, XVI), ihren Ursprung hat (145).



Dies läßt sich durch die nachstehenden experimentellen Befunde bestätigen.

	1. Hauptbande	
	λ (m μ)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
4-n-Propylamino- benzoation	281,0	17,15
PAB-Anion	265,5	14,20

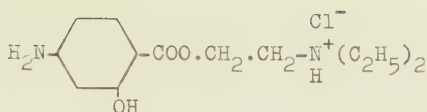
Der intakte Ester zeigt im Vergleich zum Säureanion erwartungsgemäß das Bild der bathochrom verschobenen Kurve erhöhter Intensität.



Spaltprodukte: 4-n-Butylaminobenzoation und β -Dimethylaminoäthanol.

Die geringfügige Kettenverlängerung des Aminosubstituenten um eine Methylengruppe verursacht nur eine geringe bathochrome Verschiebung der 1. Hauptbande im Vergleich zum 4-n-Propylaminobenzoation. Die Intensität der 2. Hauptbande dagegen ist deutlich geschwächt. Die Rotverschiebung des Pantocainspektrums muß also in der Hauptsache vom Substituenten am aromatischen Amin und weniger von der Kettenverlängerung des Alkohols beeinflusst werden.

Oxyprocain:
(Abb. 5)



Spaltprodukte: 2-Oxy-4-Aminobenzoation und β -Diäthylaminoäthanol.

Durch die Einführung eines dritten Substituenten in den bisher besprochenen Typ der L.A. komplizieren sich die Resonanzverhältnisse innerhalb des Moleküls. Es soll versucht werden das Benzolspektrum wieder als Grundlage der Diskussion anzunehmen. Als Vergleichssubstanz könnte im Falle des Oxyprocains das Novokain dienen. Im Absorptionsspektrum sind folgende Veränderungen festzustellen. Erhebliche Intensitätserhöhung und eine Strukturierung der Nebenbande, Intensitätserniedrigung und Verschiebung der 1. Hauptbande in kürzerwellige Bereiche.

Mit der Hydroxylgruppe befindet sich im Molekül neben der bereits vorhandenen 4-ständigen auxochromen Gruppe nun auch eine 2-ständige auxochrome Gruppe. Dadurch könnte man erwarten, daß das Spektrum einer Resultanten gleichkommt, die sich aus einer Überlagerung des Zusammenwirkens zwischen 1-antiauxochromer-, 2-auxochromer- und 4-auxochromer Gruppe zusammensetzt. Dem experimentellen Ergebnis nach scheint der Einfluß des o-Substituenten zu überwiegen.

Das Esterspektrum ist dem der undissoziierten Säure sehr ähnlich. Die Nebenbande zeigt infolge der Molekülvergrößerung durch den Alkoholrest eine höhere Intensität und Verwaschung der bei der Säure noch vorhandenen beiden Maxima der Nebenbande, von denen das kleinere noch als Schulter zu erkennen ist.

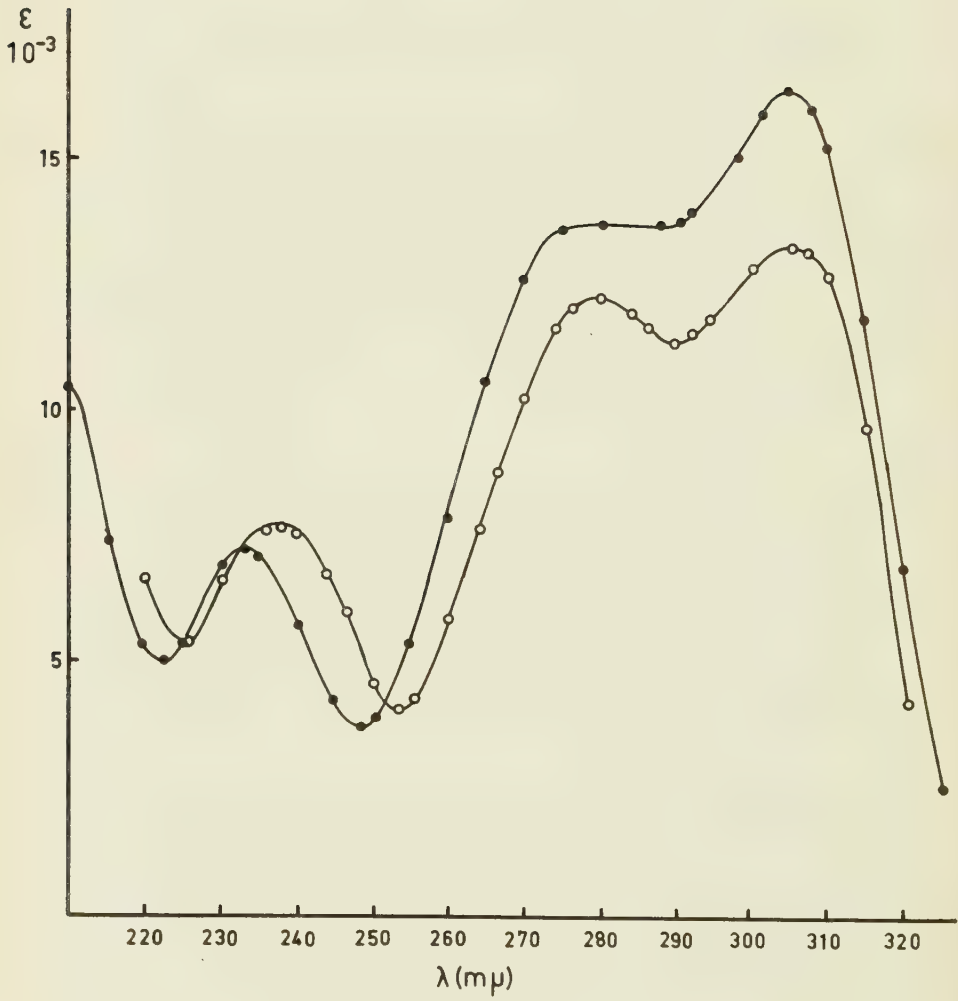
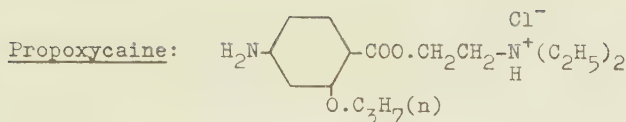


Abb. 5

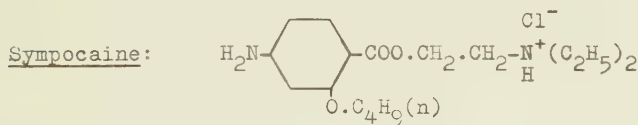
●●● Oxypocain

○○○ 2-Oxy-4-aminobenzoessäure



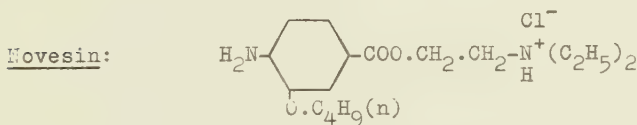
Spaltprodukte: 2-n-Propoxy-4-aminobenzoation und
β-Diäthylaminoäthanol.

Die Alkylierung der Oxygruppe bewirkt im Vergleich zum Oxyprocain Intensitätserhöhung, die sich besonders bei der 1. Hauptbande durch eine Zunahme des molaren Extinktionskoeffizienten um $4\cdot 10^3$ bemerkbar macht. Das Spektrum des Säureanions ist insgesamt in kürzere Wellenlängen verschoben, das 2. Maximum der Nebenbande bei 279 mμ erscheint bei 259 mμ mit einer Intensität von $\epsilon = 10,2\cdot 10^3$, während das 1. Maximum bei 290 mμ nur noch als Schulter auftritt.



Spaltprodukte: 2-n-Butoxy-4-aminobenzoation und
β-Diäthylaminoäthanol.

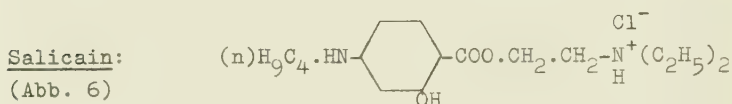
Sowohl das Spektrum des Säureanions als auch das des Esters entsprechen erwartungsgemäß denen des Propoxycaines.



Spaltprodukte: 3-n-Butoxy-4-aminobenzoation und
β-Diäthylaminoäthanol.

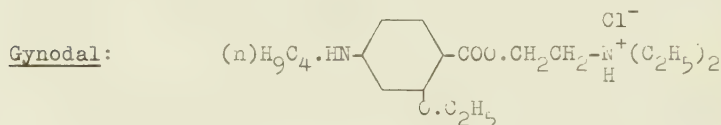
Movesin unterscheidet sich vom Sympocaine nur durch 3-Stellung der Butoxygruppe. Zwar bleibt das Spektrum der o-Verbindung in seiner Charakteristik erhalten, es wirkt sich

jedoch die räumliche Annäherung des Auxochroms an die p-Aminogruppe auf die Resonanzverhältnisse des Gesamtmoleküls so aus, daß die Veränderungen im Spektrum offenbar von einem stärker gewordenen Einfluß des p-Substituenten herrühren, denn die Intensitätserniedrigung der Nebenbande und gleichzeitige Intensitätserhöhung der 1. Hauptbande sind Auswirkungen einer Wechselbeziehung zwischen p-ständigem Auxochrom und Antiauxochrom.



Spaltprodukte: 2-Oxy-4-n-butylaminobenzoation und
β-Diäthylaminoäthanol.

Salicain unterscheidet sich vom Oxyprocain durch Substitution in der p-Aminogruppe und wie bei den analogen Verbindungen der Pantocainreihe wird auch hier das Spektrum bathochrom verschoben. Der Einfluß des o-Substituenten scheint verstärkt zu sein, da vor allem die Intensität der Nebenbande, im Vergleich zum Spektrum des Oxyprocains, erhöht ist.

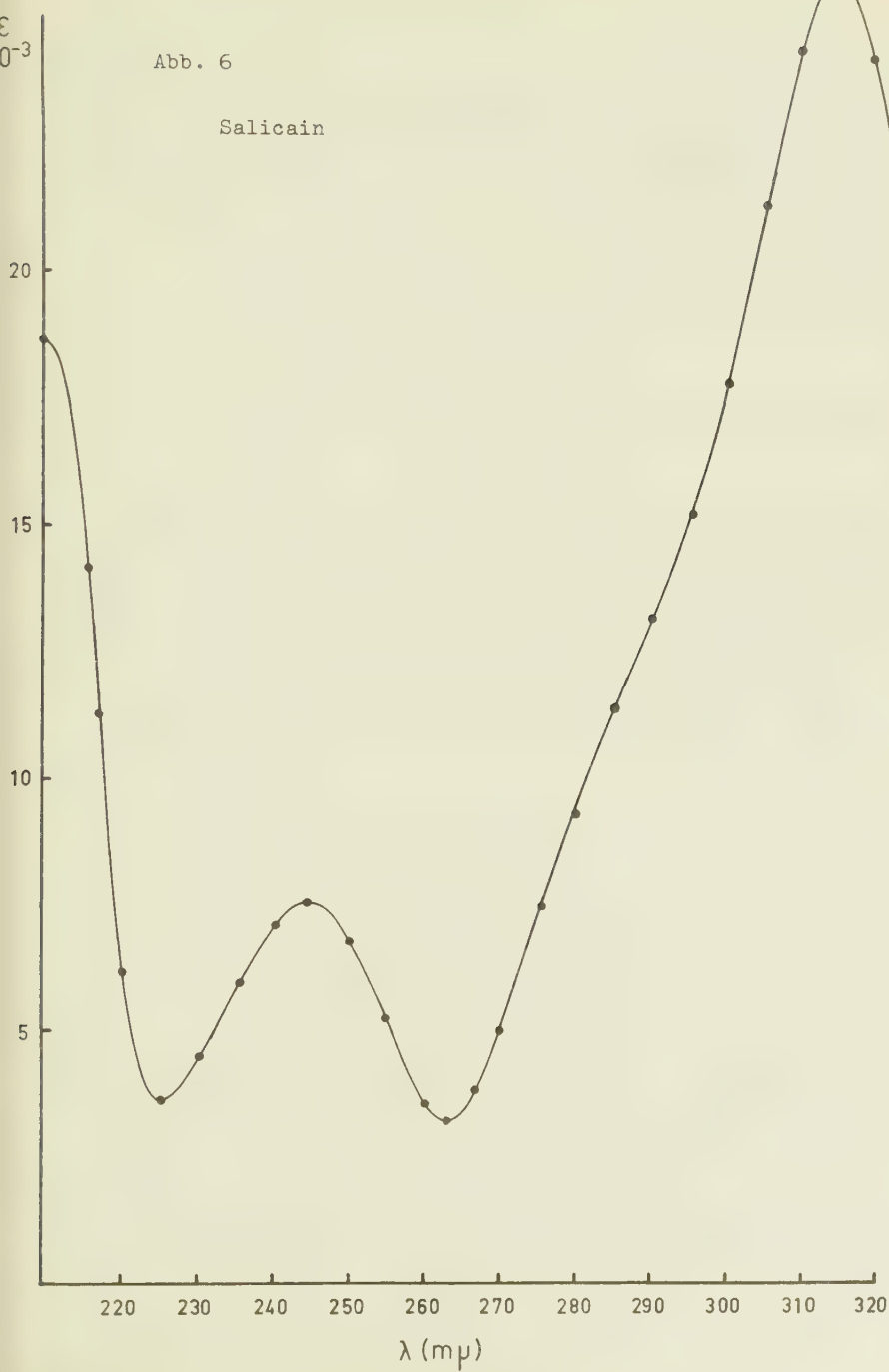


Spaltprodukte: 2-Äthoxy-4-n-butylaminobenzoation und
β-Diäthylaminoäthanol

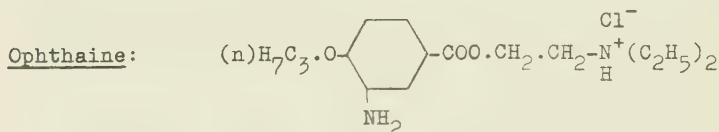
Die Alkylierung der Hydroxylgruppe ändert die Resonanz so, daß der Einfluß der Alkylgruppe auf das Spektrum verstärkt wird. Er ist erkenntlich an der hypsochromen Verschiebung der Maxima und vor allem an der Intensitätserniedrigung der Nebenbande und Intensitätserhöhung der 1. Hauptbande. Das Spektrum des Säureanions zeigt außer einer weiteren hypsochromen Verschiebung der Banden auch

Abb. 6

Salicain



eine nochmalige Intensitätserniedrigung der Nebenbande und Intensitätserhöhung der 1. Hauptbande. (Durch die Ionisierung der Carboxylgruppe und der damit verbundenen Hemmung der Aufnahmefähigkeit von Elektronen aus dem Benzolring).



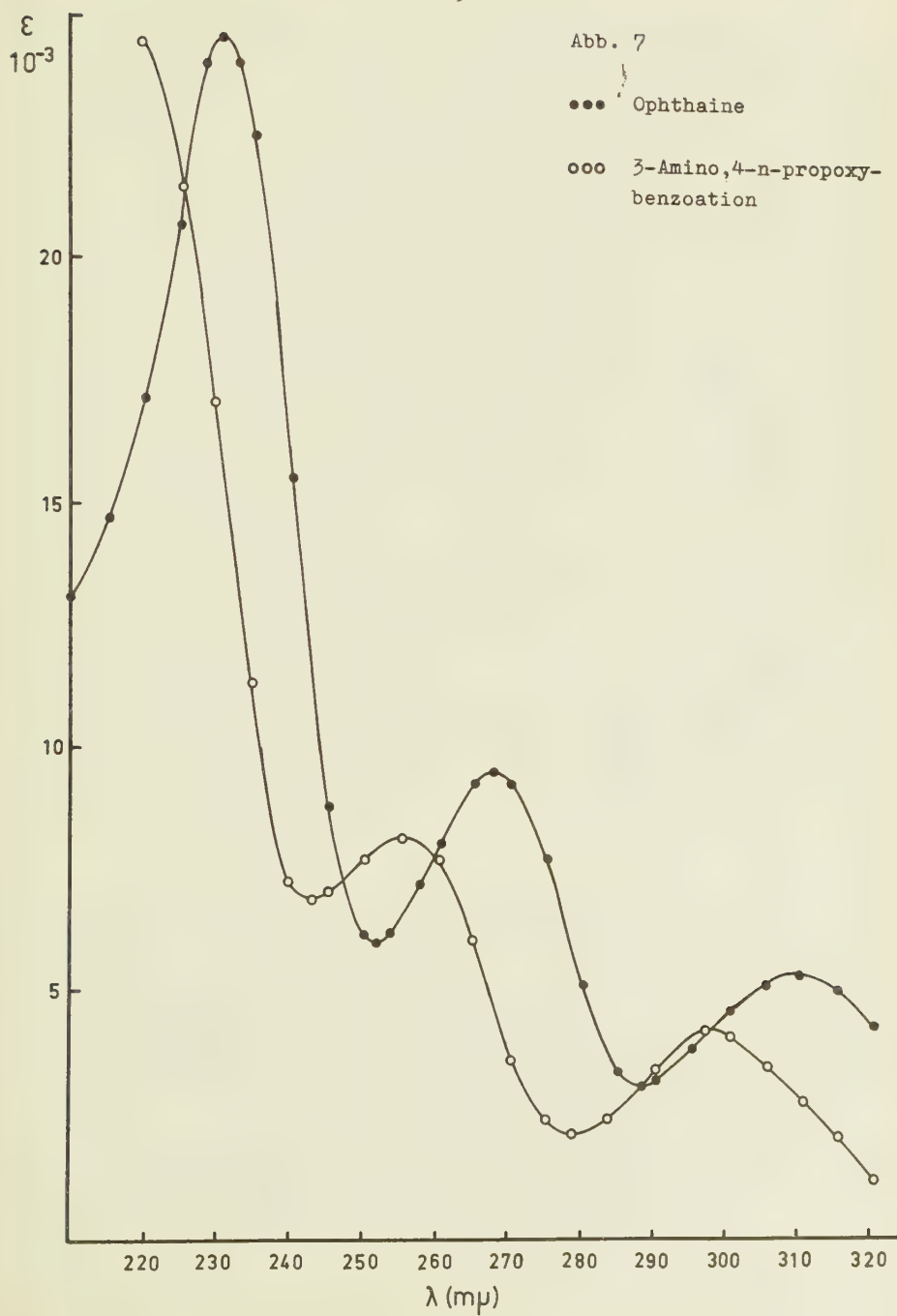
Spaltprodukte: 3-Amino-4-n-propoxybenzoation und
β-Diäthylaminoäthanol.

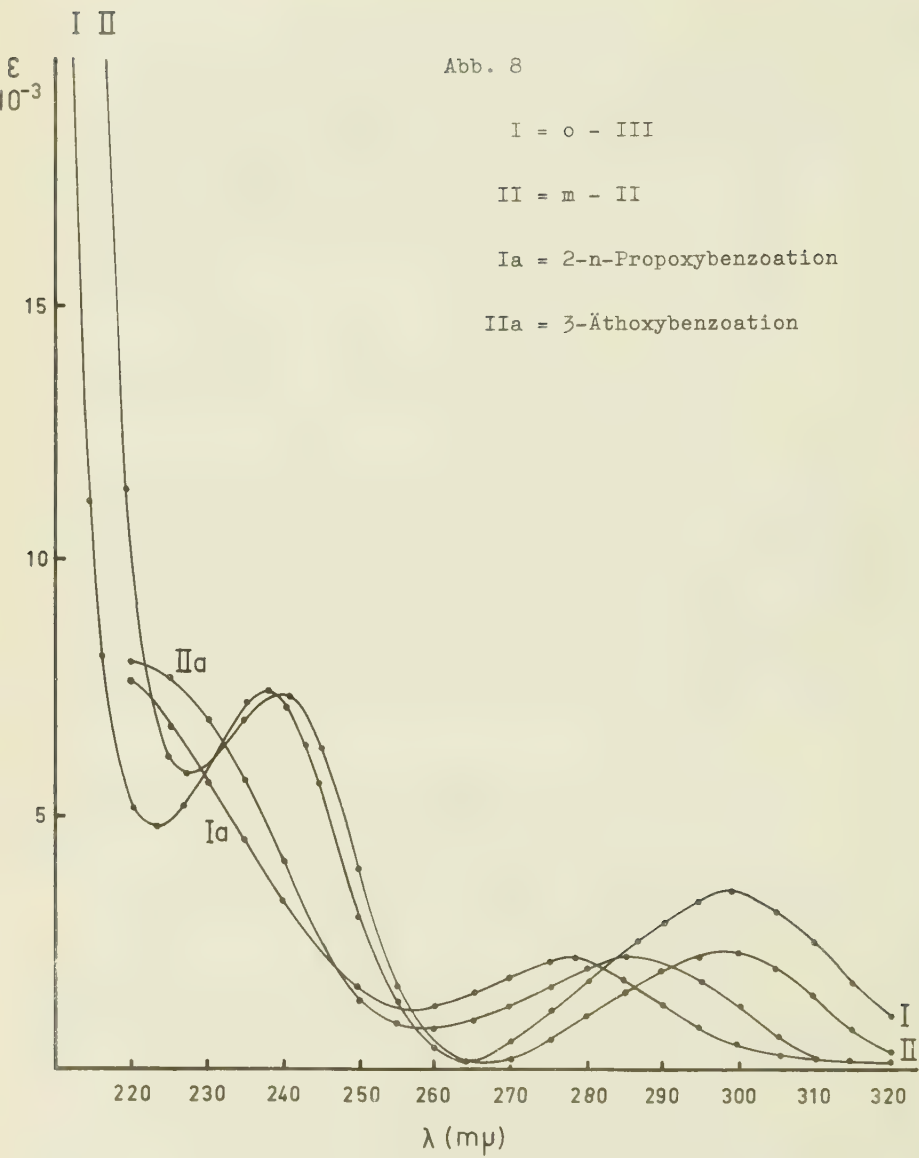
Die Vertauschung einer 4-ständigen Amino- mit einer 3-ständigen Alkoxygruppe verändert das vergleichbare Spektrum des Novesins folgendermaßen: Vor allem die 1. und 2. Hauptbande werden bathochrom verschoben, während die Lage der Nebenbande kaum verändert wird. In ihrer Intensität ist sie jedoch erheblich geschwächt. Das durch Hydrolyse entstandene Säureanion zeigt den gleichen Kurvenverlauf hypsochrom verschoben und in der Intensität der 1. und 2. Hauptbande geschwächt.

Homologe Alkoxybenzoesäure-β-diäthylaminoäthylester

Für die Spektren der 4-Alkoxybenzoesäureester gilt das für Intracaine bzw. Stadacain gesagte, da diese Verbindungen homologe Glieder dieser Reihe sind und den Verbindungen p-II bzw. p-IV entsprechen. (Vgl. Seiten 33 - 37).

Die systematische Molekülvergrößerung durch Erweiterung der Alkoxygruppe wirkt sich auf die bathochrome Verschiebung und Intensitätserhöhung des Maximums der 1. Hauptbande nur unbedeutend aus. (Vgl. Tab. II, lfd. Nr. 20 - 35). Der molare Extinktionskoeffizient nimmt von der p-Methoxy- zur p-Butoxyverbindung nur um $0,9 \cdot 10^3$ zu. Bei der p-i-Propoxyverbindung nimmt ϵ ab, um beim p-i-Butoxyester den höchsten Wert der Reihe zu erreichen.





Die Ähnlichkeit der analogen o- und m- Alkoxybenzoesäure-ester (Abb. 8) erklärt sich aus den für diese Verbindungen gültigen Regeln, daß nämlich bei einer Wechselbeziehung zwischen Auxochrom und Antiauxochrom ($-O.R$ bzw. $-COO.R$) die Nebenbande bathochrom verschoben und von höherer Intensität ist, als bei den entsprechenden p-Verbindungen. Begründet wird dies durch eine, bei den o- und m-Verbindungen erfolgten Vektorsubtraktion über einen Winkel von 60° bzw. 120° , der durch Überlagerung der verschiedenen möglichen Mesomerien im Benzolkern entstehenden elektrischen Momente. Bei den p-Verbindungen erfolgt diese Subtraktion dagegen über einen Winkel von 180° (140°). Da angenommen werden darf, daß zur 1. Hauptbande der Elektronenübergang in Richtung der Bindung der Substituenten gehört, der bei den p-Verbindungen besonders ausgeprägt ist und bei diesen eine starke Verschiebung bewirkt, ist die Verschiebung bei den analogen o- und m-Verbindungen gleich, aber schwächer. Die Zu- bzw. Abnahme der molaren Extinktionskoeffizienten der Banden erfolgt bei den o-Verbindungen nicht parallel zur Vergrößerung des Alkoxy-Substituenten. Bei den m-Verbindungen ist dieser Zusammenhang jedoch vorhanden. Außerdem korrespondiert hier der höchste Wert für das Maximum der 1. Hauptbande mit dem niedrigsten für das Maximum der Nebenbande, wie auch die 1. Hauptbande geringster Intensität und die Nebenbande größter Intensität in einem Spektrum vereint sind. (Vgl. Tab. II).

3.3 Ergebnisse der Messung der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit

In Vorversuchen wurde zunächst die Aktivität des Serums bzw. der Esterase untersucht (vgl. 4.2.4 und 4.2.5) und eine, unter Berücksichtigung der Durchlässigkeit geeignete Konzentration ausgewählt. Die Wahl einer zur Messung geeigneten Wellenlänge hing nicht nur von einer größtmöglichen Extinktionsdifferenz des jeweiligen Esters und seiner Spaltprodukte ab, sondern auch von dem begrenzenden Faktor, des durch die Proteinnatur des Serums bedingten

Absorptionsbereiches (vgl. 4.2.1). Für jede Verbindung wurde eine optimale Wellenlänge ermittelt, bei der die Extinktionsabnahme in dem zugehörigen Punkt der Kurve beobachtet werden konnte. Nach einer modifizierten Methode von W. K a l o w (31) wurde die Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit für alle in Tabelle I aufgeführten Verbindungen, soweit sie einer Hydrolyse zugänglich waren, durchgeführt. Die Zeitintervalle der Extinktionsablesungen richteten sich nach der Geschwindigkeit mit der die Hydrolyse erfolgte.

Trägt man in ein Koordinatensystem die Extinktionen in Abhängigkeit von der Zeit ein, erhält man die typische Kurve einer enzymkatalysierten Esterhydrolyse. Als Beispiele sind in den Abbildungen 9 und 10 solche Kurven gezeichnet, wie sie beim Novokain durch Hydrolyse mit Serum und bei 4-Methoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthylester durch Hydrolyse mit Esterase erhalten wurden.

Zu Beginn der Spaltung verläuft die Extinktionsabnahme eine gewisse Zeit lang linear, d.h. entsprechend einer Reaktion 0. Ordnung, um dann im weiteren Verlauf die Reaktionsordnung zu ändern. Dem Verlauf nach ähnliche Kurven ergaben sich bei allen L.A. und AOB E)¹, die bei den Versuchsbedingungen einer Hydrolyse zugänglich waren. Eine Ausnahme machte das Pantocain, dessen Hydrolysenkurve von Anfang bis Ende einer Reaktion 0. Ordnung entsprach.

Um die maximale Spaltungsgeschwindigkeit und das Verhalten der Esterhydrolyse bei höheren Substratkonzentrationen untersuchen zu können, wurde bei konstanter Serum- bzw. Esterasekonzentration die Konzentration der untersuchten Verbindungen variiert. In Tabelle III sind die aus Kurven, wie sie in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt sind, errechneten Geschwindigkeiten v_E , sowie die Wellenlängen, bei denen die Messungen durchgeführt wurden, zusammengestellt. Die Hydrolyse des Surfacaines, Metycaines, Stadacains, Intracaines und die der AOB E wurde mit Esterase durchgeführt,

)¹ AOB E = Alkoxybenzoesäureester

Abb. 9

Enzymkatalysierte Novokain -
Hydrolyse

$T = 37,0^{\circ} \text{ C.}$ Serum - Konzentra-
tion 20 %.

Novokain - Konzentrationen:

- I = $0,5 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
- II = $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
- III = $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
- IV = $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
- V = $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$
- VI = $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

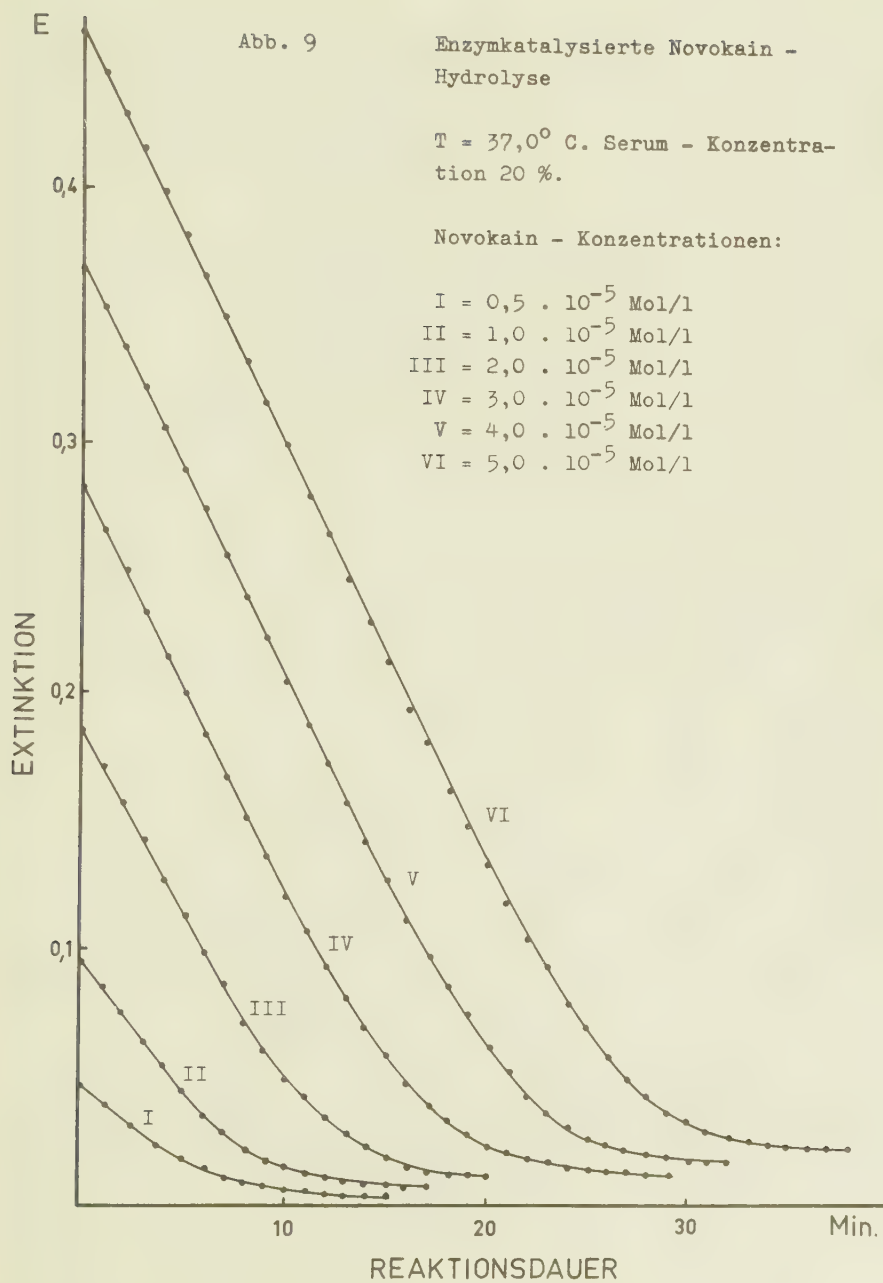


Abb. 10

Enzymkatalysierte p-I - Hydrolyse

$T = 37,0^{\circ} \text{C}$. Esterase - Konzentration entspricht einer Serum - Konzentration von 20 %.

p-I - Konzentrationen:

I = $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

II = $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

III = $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

IV = $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

V = $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

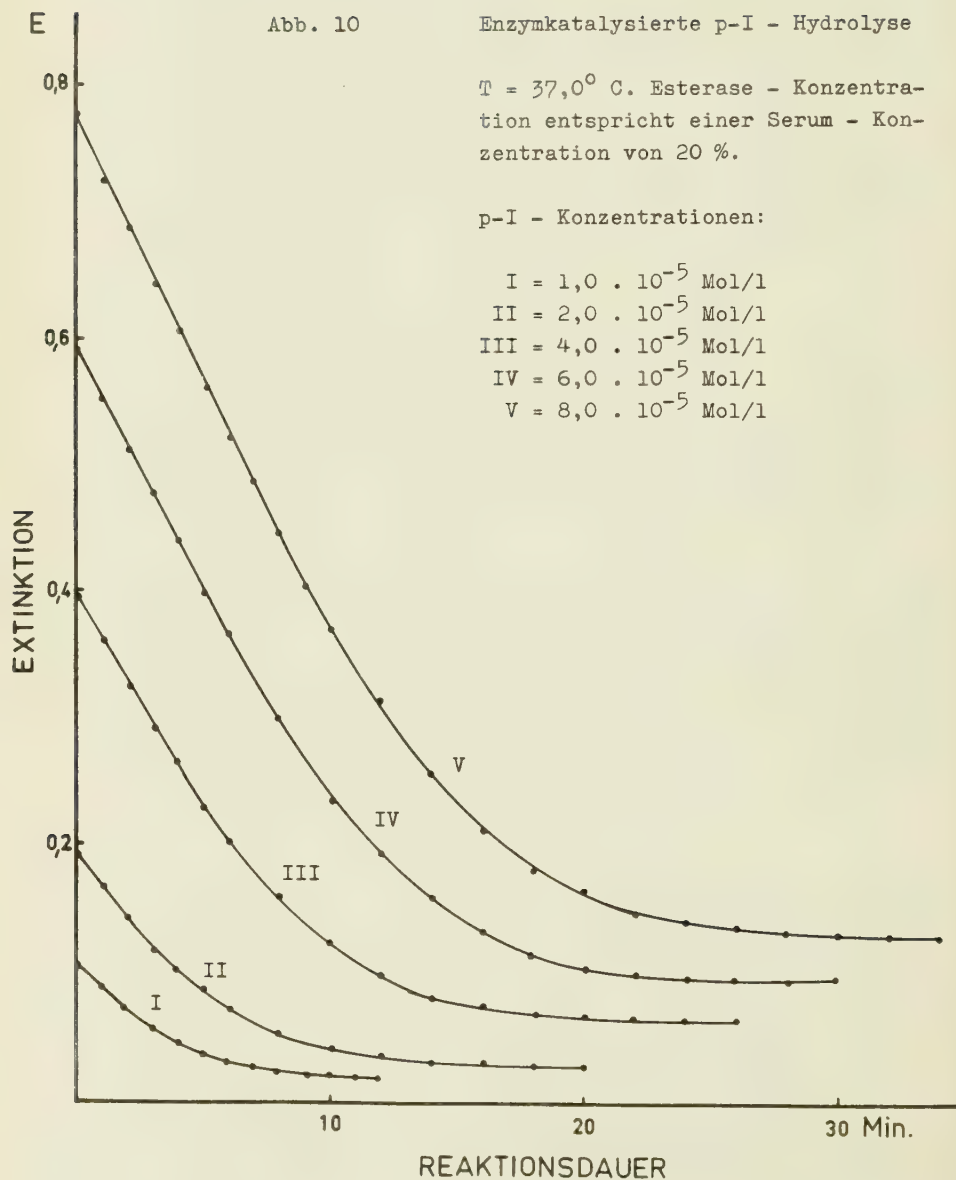


Tabelle III

Name bzw. Verb. Nr.	v_E (10^{-5} Mol/Min.)							Wellen- länge (mp)
	Konzentration (10^{-5} Mol/l)							
	0,5	1,0	2,0	4,0	5,0	6,0	8,0	
Tutocain	0,008	0,011	0,007	-	-	-	-	305
Cornecain	0,024	0,025	0,026	0,021	0,020	-	-	310
Butacaine	0,012	0,020	0,027	0,034	0,035	-	-	305
Salicain	0,041	0,045	0,048	0,048	0,036	-	-	315
Oxyprocain	0,022	0,034	0,047	0,059	0,063	0,066	0,065	315
Pantocain	0,049	0,049	0,050	0,047	-	-	-	315
Gynodal	0,034	0,062	0,062	0,063	0,063	-	-	320
Propoxycaine	0,056	0,064	0,069	0,074	0,078	0,076	-	310
Sympocaine	0,072	0,090	0,103	0,104	-	-	-	315
Larocain	0,113	0,120	0,124	0,123	0,123	0,123	0,115	310
Surfacaine	0,132	0,154	0,152	0,123	0,105	0,099	-	270
Novokain	0,086	0,122	0,162	0,182	0,183	0,182	0,177	310
Intracaine	0,097	0,155	0,205	0,295	-	0,320	0,340	280
Novesin	0,106	0,173	0,250	0,330	0,348	0,360	0,378	310
Ophthaine	0,160	0,230	0,296	0,338	0,366	0,368	0,366	310
Metycaine	0,135	0,220	0,301	0,366	0,367	0,360	0,340	245
Stadacain	0,274	0,485	0,561	0,650	-	0,720	0,710	280
o - I	0,750	1,11	1,39	1,39	-	1,21	1,00	245
m - I	0,500	0,847	1,41	1,91	-	2,13	2,06	245
p - I	0,114	0,210	0,334	0,479	-	0,480	0,475	275
o - II	0,640	0,950	1,22	1,20	-	1,20	0,910	245
m - II	0,800	1,40	2,30	3,42	-	3,85	3,83	245
p - II	0,092	0,143	0,204	0,275	-	0,306	0,322	275
o - III	0,500	0,630	0,704	0,682	-	0,650	0,461	245
m - III	0,645	1,04	1,96	2,76	-	3,20	3,23	245
p - III	0,225	0,299	0,344	0,400	-	0,440	0,450	275
o - IV	0,690	0,900	1,05	1,14	-	1,16	1,11	245
m - IV	0,770	1,36	2,25	2,98	-	2,90	2,82	245
p - IV	0,409	0,681	0,755	0,735	-	0,804	0,770	275
o - V	0,445	0,522	0,592	0,577	-	0,565	0,507	245
m - V	0,800	1,46	2,28	2,58	-	2,43	2,52	245
p - V	0,104	0,177	0,250	0,301	-	0,328	0,323	275
p - VI	0,303	0,380	0,450	0,520	-	0,510	0,510	275

die der übrigen Ester mit Serum.

Trägt man v_E in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in ein Koordinatensystem ein, erhält man für alle in Tabelle III aufgeführten Verbindungen die Substratkonzentrations-Reaktionsgeschwindigkeitskurve einer enzymkatalysierten Reaktion (vgl. 2.1.2).

In Abbildung 11 sind als Beispiele der verschiedenen Verbindungen die Kurven von Metycaine, Novokain, Novesin und Surfacaine, in Abbildung 12 als Beispiele für die AOB diejenigen von o - I, m - I und p - I gezeichnet.

Die Anfangsgeschwindigkeit steigt bis zu einem Maximum an, das von den verschiedenen Estern bei unterschiedlichen Konzentrationen erreicht wird. Butacaine, Oxyprocain, Propoxycaine, Novesin und Ophthaine, sowie m - II, p - II, m - III und p - III sind Beispiele für dieses, den Vorstellungen von Michaelis und Menten entsprechende Verhalten. Bei allen anderen Verbindungen bekommt jedoch die Kurve innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches fallende Tendenz (Abbildungen 11 und 12).

Diese Abnahme der Hydrolysegeschwindigkeit bei wachsender Substratkonzentration ist offensichtlich in einer Hemmung der Esterasenaktivität zu suchen. Es wäre z.B. daran zu denken, daß die entstehenden Spaltprodukte der Ester eine derartige Hemmung verursachen könnten. Vor allem der freiwerdende Säureanteil könnte infolge seines, dem Ester ähnlichen Aufbaus, die Ursache einer konkurrierenden Hemmung sein. Untersuchungen von K. J. N e t t e r (145) zeigten aber, daß z.B. die bei der Spaltung von Novokain auftretende PAB erst in einer Konzentration von $20 \cdot 10^{-5}$ Mol/l eine nennenswerte Hemmung ausübt. Diese Menge entspricht mehr als der doppelten Konzentration, die bei den hier durchgeführten Versuchen auftreten kann ($8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l). Derselbe Autor stellte für das andere Spaltprodukt des Novokains, den β -Diäthylaminoäthanol sogar eine Aktivierung des Enzyms fest. In einer Konzentration von $20 \cdot 10^{-4}$ Mol/l bewirkte

Abb. 11

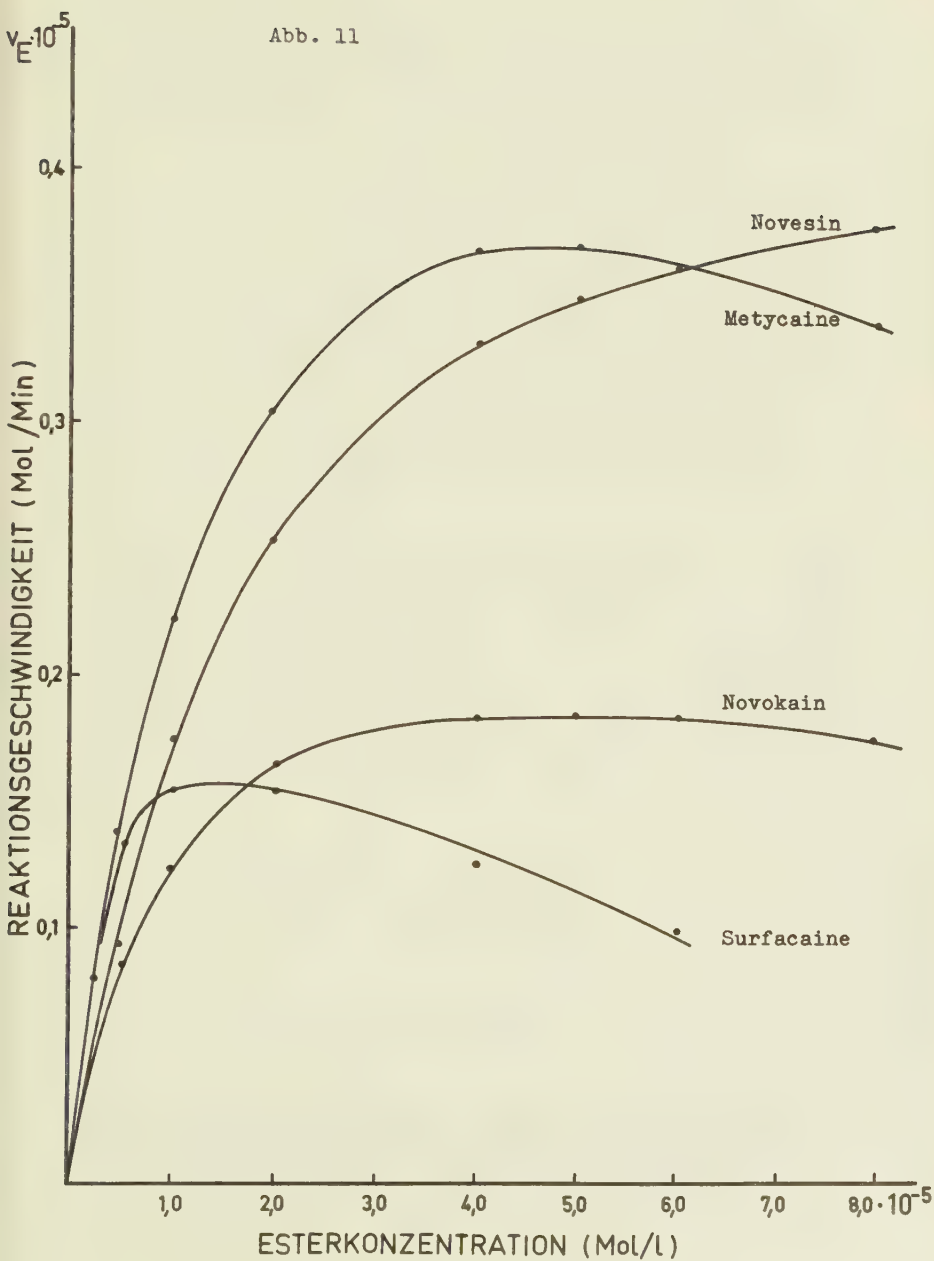


Abb. 12



er eine Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit um 22 % . F. H e i m (30) berichtet, daß ein Zusatz der Kombination beider Spaltprodukte nicht zu einer Hemmung führt. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Konzentrationen läßt sich mit dieser Annahme also nicht erklären.

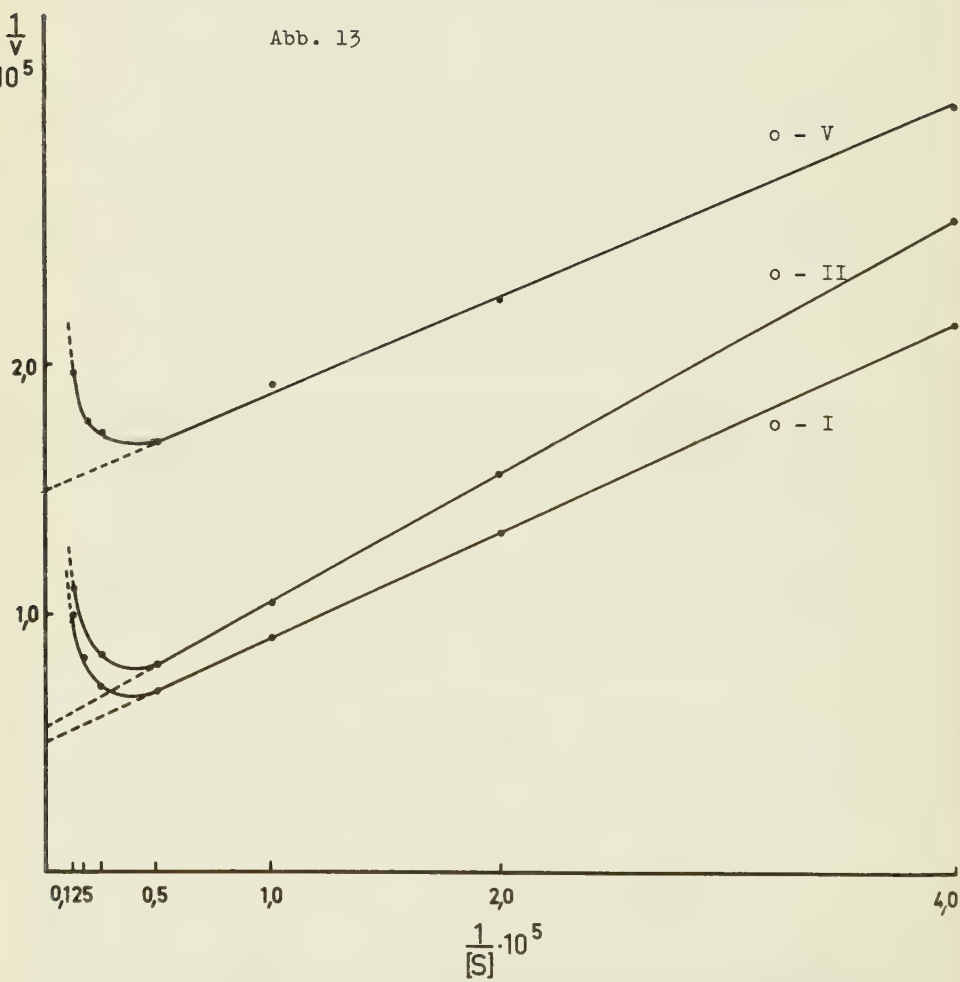
Mit Hilfe der Gleichung von H. L i n e w e a v e r und D. B u r k (146) hat man die Möglichkeit der definitiven Bestimmung des in Frage kommenden Hemmungstyps. Trägt man die Werte der reziproken Anfangsgeschwindigkeiten v_E auf der Ordinate in Abhängigkeit von den reziproken Werten der entsprechenden L.A.- bzw. AOBK-Konzentrationen ab, erhält man für alle, von den in Tab. I aufgeführten Verbindungen eine Kurve (in Abbildung 13 sind als Beispiel die von o - I, o - II und o - V gezeichnet), mit Ausnahme der auf Seite 56 genannten Ester, für die sich eine Gerade ergibt.

Die Kurven weisen auf eine kompetitive Hemmung durch das Substrat selbst, eine sogenannte Überschußhemmung hin, denn bei allen anderen Hemmungstypen - kompetitiv, nichtkompetitiv, unkompetitiv - ergeben die Hydrolysegeschwindigkeiten nach obigem Schema aufgetragen, eine Gerade, die gegenüber der ungehemmten Reaktion um einen bestimmten Betrag auf der Ordinate verschoben ist. Der aus der Lineweaver-Burk-Gleichung abgeleitete Ausdruck für die Überschußhemmung lautet: (147).

$$\frac{v_E}{V_E} = \frac{[S]}{[S] + K_m + \frac{[S]^{1+n}}{K_i}}$$

K_i = Gleichgewichtskonstante
der hemmenden Reaktion

Aus ihm geht hervor, daß eine Linearität nur bei sehr kleinen Substratkonzentrationen besteht, da $[S]$ gleichzeitig als Substrat und Hemmstoff auftritt, d.h. mit wachsender Potenz in die Gleichung eingeht. Die Hemmung der Esterase



und damit der Hydrolyse beginnt bei derjenigen Esterkonzentration, deren reziproker Wert von der Geraden nach oben abweicht. Bei Novokain z.B. ab einer Konzentration von $4,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l. Dieser Wert wird durch Untersuchungen von K. J. N e t t e r (145) bestätigt. Steigt die Konzentration weiter an, nähert sich die Kurve asymptotisch der y-Achse. Die Untersuchungen der Hemmwirkung sollen unter Berücksichtigung der nicht dem gleichen Hemmungsmechanismus folgenden Verbindungen fortgeführt werden.

3.3.3.1 Die Michaeliskonstanten

Die Michaeliskonstanten (K_m) wurden ebenfalls nach der Methode von Lineweaver und Burk grafisch ermittelt (4.2.7). In Tabelle IV sind die Werte für die in Tabelle III aufgeführten Verbindungen zusammengestellt.

Tabelle IV

Verbindung	K_m (Mol/l)	Verbindung	K_m (Mol/l)
Tutocain	$5,1 \cdot 10^{-6}$	o - I	$8,2 \cdot 10^{-6}$
Cornecain	$6,7 \cdot 10^{-7}$	m - I	$3,1 \cdot 10^{-5}$
Butacaine	$1,5 \cdot 10^{-5}$	p - I	$2,9 \cdot 10^{-5}$
Salicain	$4,6 \cdot 10^{-5}$	o - II	$7,6 \cdot 10^{-6}$
Oxyprocain	$1,2 \cdot 10^{-5}$	m - II	$3,4 \cdot 10^{-5}$
Pantocain	$8,6 \cdot 10^{-7}$	p - II	$1,6 \cdot 10^{-5}$
Gynodal	$9,0 \cdot 10^{-5}$	o - III	$3,5 \cdot 10^{-6}$
Propoxycaine	$2,4 \cdot 10^{-6}$	m - III	$4,4 \cdot 10^{-5}$
Sympocaine	$3,4 \cdot 10^{-6}$	p - III	$5,5 \cdot 10^{-6}$
Larocain	$1,5 \cdot 10^{-6}$	o - IV	$4,3 \cdot 10^{-6}$
Surfacaine	$6,8 \cdot 10^{-6}$	m - IV	$3,6 \cdot 10^{-5}$
Novokain	$9,5 \cdot 10^{-6}$	p - IV	$1,8 \cdot 10^{-5}$
Intracaine	$1,6 \cdot 10^{-5}$	o - V	$2,5 \cdot 10^{-6}$
Novesin	$1,8 \cdot 10^{-5}$	m - V	$3,1 \cdot 10^{-5}$
Ophthaine	$8,1 \cdot 10^{-6}$	p - V	$2,2 \cdot 10^{-5}$
Metycaine	$1,9 \cdot 10^{-5}$	p - VI	$4,2 \cdot 10^{-6}$
Stadacain	$3,1 \cdot 10^{-5}$		

3.3.3.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

Ordnet man die L.A. nach zunehmender, maximaler Hydrolysen-
geschwindigkeit (abgekürzt V_E) an, lassen sich bezüglich
der Konstitution folgende Beziehungen erkennen. (Vgl. Tab.V).

Am langsamsten werden im allgemeinen die 4-Amino-, bzw.
4-Alkaminester gespalten, gefolgt von den schneller hydroly-
sierbaren 4-Alkoxyestern. Von den hier untersuchten Verbind-
ungen weichen lediglich zwei von dieser Regel ab. Novesin
wird etwa doppelt so schnell wie Novokain und dreieinhalb
mal so schnell wie die stellungsisomere Verbindung, das
Sympocaine, gespalten. Durch die Verschiebung der n-Butoxy-
gruppe von 2-, in die der Aminogruppe benachbarte 3-Stel-
lung, nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit die Größenordnung
der 4-Alkoxyverbindungen an. Die 4-Cyclohexyloxyverbindung,
das Surfaccaine, wird dagegen langsamer hydrolysiert als
Novokain.

Innerhalb der homologen Reihen der L.A. wird die Hydrolyse
durch Veränderung schon bestehender, oder Einführung neuer
Seitenketten wie folgt beeinflusst:

In der Reihe: Novokain - Butacaine - Tutocain - Larocain,
wird Novokain als der am einfachsten gebaute Ester am
schnellsten gespalten. Mit zunehmender Verlängerung der
Aminoalkoholseitenkette sinkt die Hydrolysegeschwindigkeit
über Larocain zum Butacaine ab. Die große Stabilität des
Tutocains, für das die kleinste V_E aller untersuchten Ver-
bindungen gefunden wurde, ist sehr wahrscheinlich auf die
Veresterung mit einem sekundären Alkohol zurückzuführen.
Diese Ergebnisse stimmen mit denen von R. M. L e v i n e
und B. B. C l a r k (148), sowie F. F. F o l d e s und
Mitarbeitern (149) überein, die an lokalanästhetisch wirk-
samen Estern gleichen Typs bezüglich der Kettenverlängerung
und Substitution am α -C-Atom des Aminoalkohols dieselben
Zusammenhänge feststellten, daß nämlich die Stabilität vom
primären über den sekundären zum tertiären Alkohol ansteigt

und kurzkettige Alkohole zu einem schnelleren Abbau führen als längerkettige. Mit steigender V_E folgen die 4-Alkaminester der Pantocainreihe. Hier zeigt sich, daß eine Verlängerung der Alkoholkette auf die Spaltungsgeschwindigkeit einen größeren Einfluß ausübt, als eine Veränderung der 4-ständigen Alkaminkette, denn Pantocain wird fast doppelt so schnell gespalten wie Cornecain, das an Stelle der n-Butylaminogruppe nur eine n-Propylaminogruppe aufweist, in dem aber der β -Dimethylaminoäthanol durch γ -Dimethylamino- β -hydroxy-n-propanol ersetzt ist. Ein solches Verhalten, bei dem der Einfluß des Alkohols größer ist, als der der Säure, beobachteten auch C. R o h m a n n und G. H e l m s t ä d t e r (10) bei der alkalischen Verseifung von Piperidinoalkoxybenzoesäureestern. Gegenüber den vergleichbaren Verbindungen mit primärer Aminogruppe zeigt sich aber der stabilisierende Einfluß der sekundären Aminogruppe. So wird Novokain etwa vier mal so schnell gespalten wie Pantocain und Butacaine 1,4 mal schneller als Cornecain. Auch diese Ergebnisse finden ihre Bestätigung durch die Arbeit von R. M. L e v i n e und B. B. C l a r k (148).

Die Molekülvergrößerung durch Einführung von 2-Oxy-, bzw. 2-Alkoxygruppen in das Pantocain scheint die enzymatische Spaltfähigkeit mit wachsender Länge der Seitenkette zu begünstigen. So besitzt das Salicain (2-Oxy-Pantocain) etwa die gleiche maximale Hydrolysegeschwindigkeit wie die Stammverbindung. Die homologe Äthoxyverbindung, das Gynodal, wird dagegen 1,3 mal schneller hydrolysiert. Dieser Einfluß der Kettenverlängerungen von Alkoxygruppen zeigt sich ebenfalls in der Novokainreihe. Zwar werden die entsprechenden 2-Oxy-, bzw. 2-Alkoxyverbindungen Oxyprocain, Propoxycain und Sympocaine langsamer gespalten als Novokain selbst, jedoch nimmt die Geschwindigkeit mit wachsender Seitenkette in der Reihenfolge: $-OH < -O.C_3H_7(n) < -O.C_4H_9(n)$ zu.

Setzt man die maximale Hydrolysegeschwindigkeit des Novokains gleich 1, ist das Verhältnis der relativen Geschwindigkeiten: 1 : 0,34 : 0,43 : 0,58. W. K a l o w (31), der

die Einwirkung gereinigter Serumcholinesterase des Menschen auf die 2-Methoxy-, 2-Äthoxy-, 2-Propoxy-, 2-Butoxy- und 2-Pentoxyverbindungen des Novokains untersuchte, fand, daß die erwähnten o-Substituenten ungefähr mit der halben Geschwindigkeit wie das Novokain selbst gespalten werden.

In der Reihe der 4-Alkoxybenzoesäureester wird in Gegenwart von Esterasen ebenfalls die 4-n-Butoxyverbindung (Stadacain) schneller gespalten als die 4-n-Propoxy- und 4-Äthoxyverbindung (Intracaine).

Von den untersuchten L.A. zeigten Cyclaine und Stovaine nicht das gewohnte, bei der Hydrolyse zu beobachtende Bild einer Extinktionsabnahme, sondern eine Zunahme, obwohl das Spektrum des, in dem in Frage kommenden Bereich absorbierenden Spaltproduktes Benzoesäureanion, eine wesentlich niedrigere Extinktion aufweist als der intakte Ester. Dieses Verhalten der einfachen Benzoesäureester könnte in ursächlichem Zusammenhang mit der sekundären, bzw. tertiären Alkoholgruppe gebracht werden, denn das Metycaine, ein homologes des Cyclaines, bei dem die Veresterung mit einem primären Alkohol durchgeführt ist, zeigt diese Erscheinung nicht.

Die im Lineweaver - Burk - Diagramm zur Bestimmung der Michaeliskonstanten ermittelten theoretischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeiten-sie werden in dieser Arbeit mit V bezeichnet - die einer ungehemmten Reaktion entsprechen, liegen, wie man aus den experimentellen Versuchen erwarten konnte, höher als V_E . Ihre Werte sind in Tabelle V, Spalte 2 zusammengefaßt. Bei Propoxycaine und Cornecain wird V von V_E fast erreicht, näherungsweise ist dies der Fall bei Tutocain und Pantocain. Betrachtet man die konstitutionellen Beziehungen der L.A. zur theoretischen maximalen Hydrolysegeschwindigkeit, ergeben sich wieder die gleichen qualitativen Zusammenhänge wie sie für V_E beschrieben wurden. Eine Ausnahme macht das Gynodal, dessen V 10 mal so hoch ist wie V_E . Bei den übrigen Verbindungen gestaltet sich das Verhältnis $V_E : V$ annähernd wie 1 : 2,5.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen den Schluß zu, daß von einem Liter menschlichem Blutserum in einer Minute maximal 3,3 mg Novokain abgebaut werden können. Diese Menge ist kleiner als die von W. K a l o w (31) gefundene (6,75 mg), aber größer als der von K. J. N e t t e r (145) mit 1,3 mg und K. S o e h r i n g und Mitarbeitern (150) angegebene Wert.

Betrachtet man die AOB E - Reihe bezüglich eines Zusammenhanges zwischen Konstitution und maximaler Hydrolysegeschwindigkeit (vgl. dazu Tab. V) zeigt sich innerhalb der Stellungsisomeren Verbindungen ohne Ausnahme ein Anwachsen der Geschwindigkeit von der p-Verbindung über die o-Verbindung zur m-Verbindung. D.h. die 3-Alkoxybenzoesäureester werden schneller gespalten als die entsprechenden 2-Alkoxybenzoesäureester und diese wiederum schneller als die 4-Alkoxybenzoesäureester. Beim Einhalten physiologischer Versuchsbedingungen, läßt sich also für die in dieser Arbeit untersuchten AOB E bezüglich der Stellungsisomerie ein Zusammenhang mit der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit finden, der anscheinend auch für trisubstituierte, stellungsisomere Verbindungen gilt, denn Sympocaine (Tab. 1, lfd. Nr 15) wird erheblich langsamer gespalten als Novesin (Tab. 1, lfd. Nr. 16).

Auch bei den AOB E ist die theoretische Maximalgeschwindigkeit höher als die experimentell gefundene, wie diese verhält sie sich im allgemeinen zur Stellungsisomerie so, daß sie in der Reihenfolge $p < o < m$ - Verbindung zunimmt. Eine Ausnahme macht nur p-IV, deren V größer ist, als die der o-Verbindung.

Die Beziehungen zur V_E innerhalb der homologen Reihen gestaltet sich folgendermaßen.

In der Reihe der o-Verbindungen nimmt die Hydrolysegeschwindigkeit von der Methoxy- über die Äthoxy- zur n-Propoxyverbindung ab und erreicht bei der n-Butoxyverbindung wieder einen Wert, der sich dem der Äthoxyverbindung nähert. Der Anstieg

der maximalen experimentellen Hydrolysengeschwindigkeit von o-III zu o-IV findet seine Parallele bei Propoxycaïne und Sympocaine. Bei den m-Verbindungen besteht eine Kontinuität von m-II bis m-IV in der Weise, daß mit wachsender Alkoxykette eine fortschreitende Abnahme der Geschwindigkeit verbunden ist. Die V_E des ersten Gliedes der Reihe, m-I, ist kleiner als die der n-Butoxyverbindung. Die Hydrolysengeschwindigkeiten der p-Verbindungen verhalten sich zu denen der m-Körper entgegengesetzt, sie nehmen von p-II bis p-IV zu. p-I macht als erstes Glied der Reihe wieder eine Ausnahme. Die Geschwindigkeit ist größer als $V_{E(p-III)}$, aber kleiner als $V_{E(p-IV)}$. Auch hier findet sich bei den gebräuchlichen L.A. eine Parallele. Intracaine (= p-II) wird langsamer gespalten als Ophthaine und dieses wiederum langsamer als Stadacain (= p-IV).

Die stellungsisomeren i-Propoxyverbindungen wurden durchweg langsamer abgebaut als die n-Propoxy-Homologen. Von den i-Butoxyverbindungen stand nur der 4-i-Butoxybenzoesäureester zur Verfügung. Für p-V und p-VI trifft ebenfalls die für die n-Verbindungen gemachte Feststellung der Zunahme von V_E in Richtung der Kettenverlängerung zu.

Mit Einschränkungen können für die theoretisch ermittelten Maximalgeschwindigkeiten die gleichen Aussagen gemacht werden. Es gelang nicht, definitive Unterschiede für V der Verbindungen m-II, m-III und m-IV, sowie p-V und p-VI festzustellen.

Tabelle V

Name bzw. Verb.Nr.	V_E (10^{-5} Mol/Min.)	V (10^{-5} Mol/Min.)
Tutocain	0,011	0,015
Cornecain	0,026	0,027
Butacaine	0,035	0,048
Salicain	0,048	0,080
Pantocain	0,050	0,058
Gynodal	0,063	0,625
Oxyprocain	0,066	0,077
Propoxycaïne	0,078	0,079
Sympocaine	0,106	0,121
Larocain	0,124	0,145
Surfacaine	0,154	0,312
Novokain	0,183	0,238
Intracaine	0,340	0,400
Metycaine	0,366	0,630
Ophthaine	0,368	0,416
Novesin	0,378	1,10
Stadacain	0,720	2,00
o - I	1,39	2,00
m - I	2,13	3,57
p - I	0,480	0,834
o - II	1,22	1,69
m - II	3,85	6,25
p - II	0,322	0,322
o - III	0,704	0,847
m - III	3,23	6,25
p - III	0,450	0,464
o - IV	1,16	1,32
m - IV	2,98	6,25
p - IV	0,804	1,92
o - V	0,592	0,666
m - V	2,58	5,90
p - V	0,328	0,555
p - VI	0,520	0,555

Der Versuch die Michaeliskonstante als Maß für die Stabilität der L.A. in Serum heranzuziehen, ist nicht in befriedigender Weise gelungen. Die nach K_m aufgelöste Michaelis-Menten-Gleichung (2.1.2) lautet:

$$K_m = [S] \left(\frac{V}{v} - 1 \right)$$

D.h. K_m ist von drei Größen abhängig, die bei verschiedenen Substanzen in unterschiedlicher Beziehung zueinander stehen (vgl. Tabellen III und V), so daß es verständlich erscheint, wenn Vergleiche analog denjenigen zwischen Konstitution und Spaltungsgeschwindigkeit nicht ohne weiteres aufgestellt werden können. Es wurde untersucht ob die theoretischen und experimentellen Maximalgeschwindigkeiten in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen. Setzt man in der obigen Gleichung für v die experimentelle Maximalgeschwindigkeit ein und für V die theoretisch ermittelte, müßte der Quotient V / v derjenigen Verbindungen einen Vergleich zulassen, die bei der gleichen Konzentration die experimentelle Maximalgeschwindigkeit erreichen, denn dann ist $[S]$ ebenfalls eine Konstante. Wie aus Tabelle III ersichtlich ist, wird V_E von einer Reihe L.A. bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/L erreicht. Ordnet man sie in der Reihenfolge der ansteigenden V / v - Werte an, erhält man folgendes Bild:

Cornecain < Larocain < Sympocaine < Pantocain < Salicain < Surfacaine < Gynodal.

Es ergibt sich, daß auch auf diesem Wege keine Beziehung zu ihrer Stabilität gegenüber Esterasen gefunden werden kann, denn sonst müßte die Reihenfolge lauten:

Cornecain < Salicain < Pantocain < Gynodal < Sympocaine < Larocain < Surfacaine.

Die Ursache einer fehlenden Gesetzmäßigkeit liegt wahrscheinlich einmal in der Natur der K_m begründet, die nicht wie Michaelis und Menten annahmen, den Charakter einer Dissoziationskonstanten der Enzym-Substrat-Verbindung (k_1/k_2 in Gleichung 1, Seite 11) hat, sondern vielmehr als eine Konstante angesehen werden kann, die wiederum aus zwei Teilkonstanten zusammengesetzt ist, nämlich k_1/k_2 und k_3 .

Michaelis und Menten hatten nicht den Zerfall des Zwischenkomplexes in die Endprodukte in K_m mit aufgenommen. Die Michaeliskonstante charakterisiert also das dynamische Gleichgewicht von wenigstens drei Reaktionen (151).

Der andere Grund scheint in der Anwendung der Serumkonserve zu liegen. Es wäre interessant, die Versuche mit einem hochgereinigten Serumcholinesterase-Präparat durchzuführen, denn die Versuchsreihe der AOBÉ, in der die aus der Serumkonserve hergestellte "gereinigte Esterase" (vgl. 4.2.1) zur Anwendung kam, läßt wenigstens innerhalb der stellungsisomeren Verbindungen eine gewisse Abhängigkeit der K_m erkennen. Ohne Ausnahme steigt die K_m von der o- zur m-Verbindung an, um bei den p-Verbindungen wieder abzunehmen. Von einer Parallelität zur enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit kann man also nicht sprechen, denn dort besitzt die p-Verbindung den niedrigsten Wert und die Reihenfolge nach steigender Reaktionsgeschwindigkeit geordnet heißt: $p < o < m$, während die Reihenfolge mit steigender K_m $o < p < m$ lautet. In der Reihe der Kettenhomologen entsprechen nur die Michaeliskonstanten der o-Verbindungen in ihrem Verhalten den entsprechenden V_E , d.h. mit fallender enzymatischer Hydrolysegeschwindigkeit wird auch K_m kleiner und umgekehrt.

3.3.4 Ergebnisse der Messung der alkalischen Hydrolysegeschwindigkeit

Um bei einem Vergleich mit der enzymatischen Hydrolyse einen methodischen Fehler auszuschalten, wurde der Versuch gemacht, die hydroxylionenkatalysierte Hydrolyse nach dem gleichen Verfahren zu bestimmen, d.h. die kontinuierliche Abnahme der Esterkonzentration durch Messung der Extinktionen spektrofotometrisch zu erfassen.

Obwohl die alkalische Esterspaltung unter den hier eingehaltenen Bedingungen einer Reaktion erster Ordnung folgt (vgl. 2.2.1), verläuft die Kurve zu Beginn der Reaktion

noch geradlinig genug um zu gestatten, daß innerhalb eines, im Vergleich mit der entsprechenden Kurve der enzymatischen Hydrolyse natürlich engeren Bereiches, die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse nach der bereits angewandten Methode bestimmt werden können (vgl. 4.3.3).

Trägt man in einem Koordinatensystem auf der Ordinate die Extinktionen, auf der Abszisse die dazugehörigen Zeitintervalle auf, erhält man die Kurve der alkalischen Esterspaltung. In den Abbildungen 14 und 15 sind als Beispiele die Kurven von Novokain und p-IV für mehrere Konzentrationen, bei Hydrolyse mit einer 0,25 n NaOH gezeichnet. Die Temperatur betrug für alle Versuche $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Abb. 14

Hydroxylionenkatalysierte
Novokain - Hydrolyse

$T = 37,0^{\circ} \text{C.}$ $0,25n \text{ NaOH}$

Novokain - Konzentrationen:

I = $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

II = $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

III = $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

IV = $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

V = $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

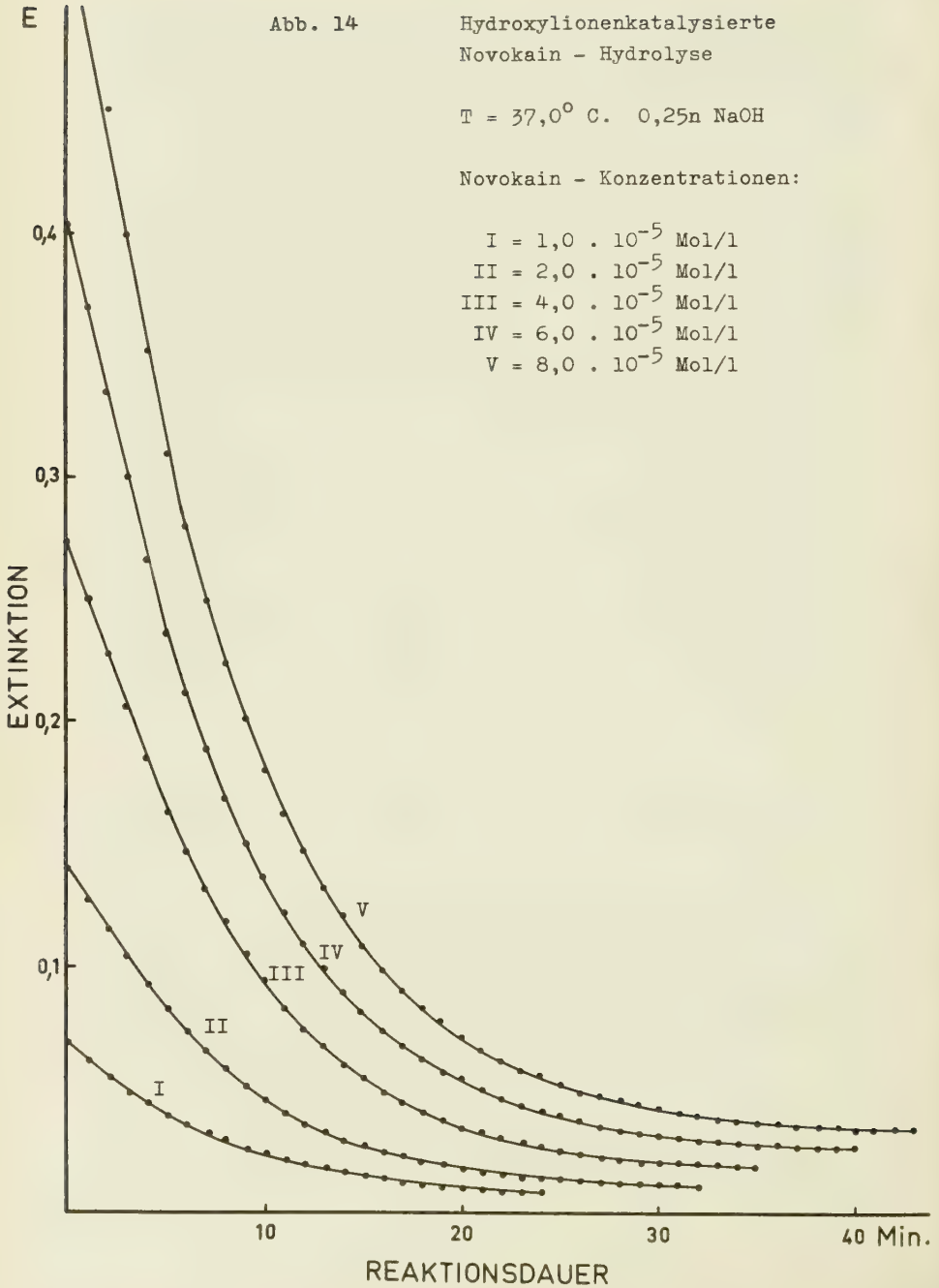


Abb. 15

Hydroxylionenkatalysierte
Hydrolyse von p-IV

$T = 37,0^{\circ} \text{ C.}$ $0,25n \text{ NaOH}$

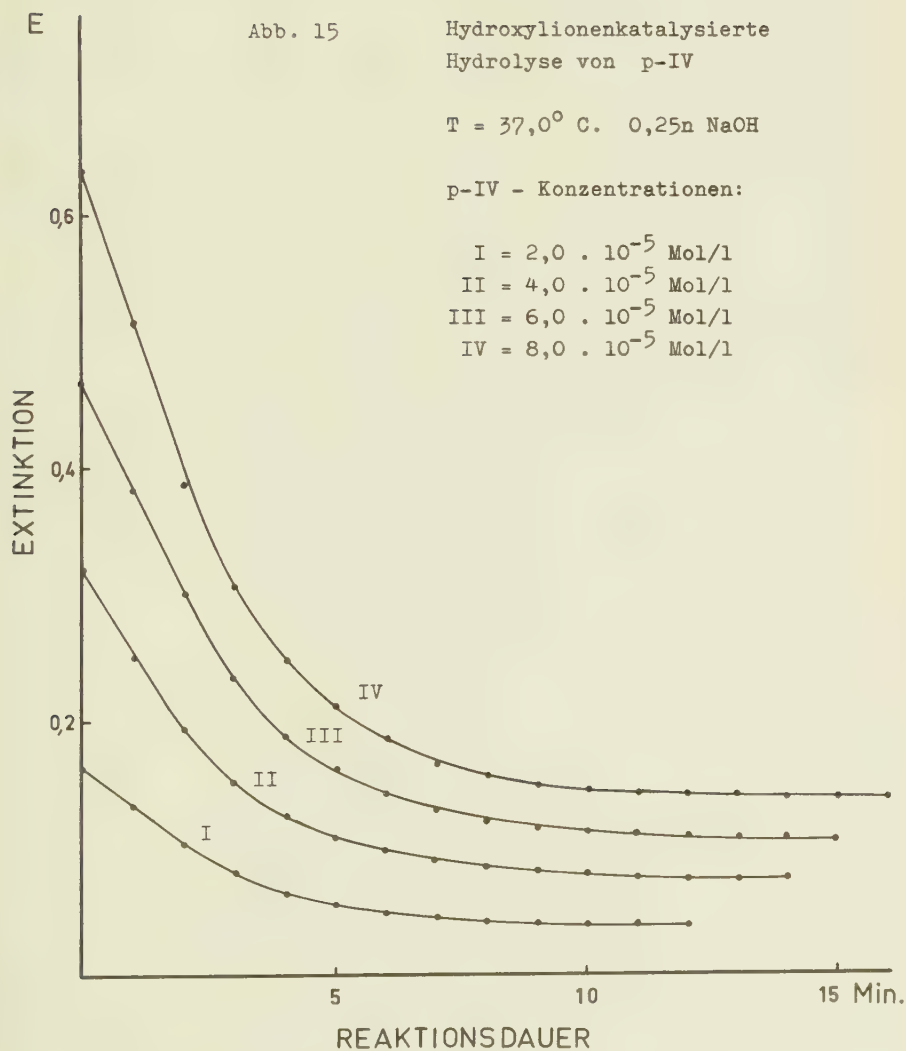
p-IV - Konzentrationen:

I = $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

II = $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

III = $6,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

IV = $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$



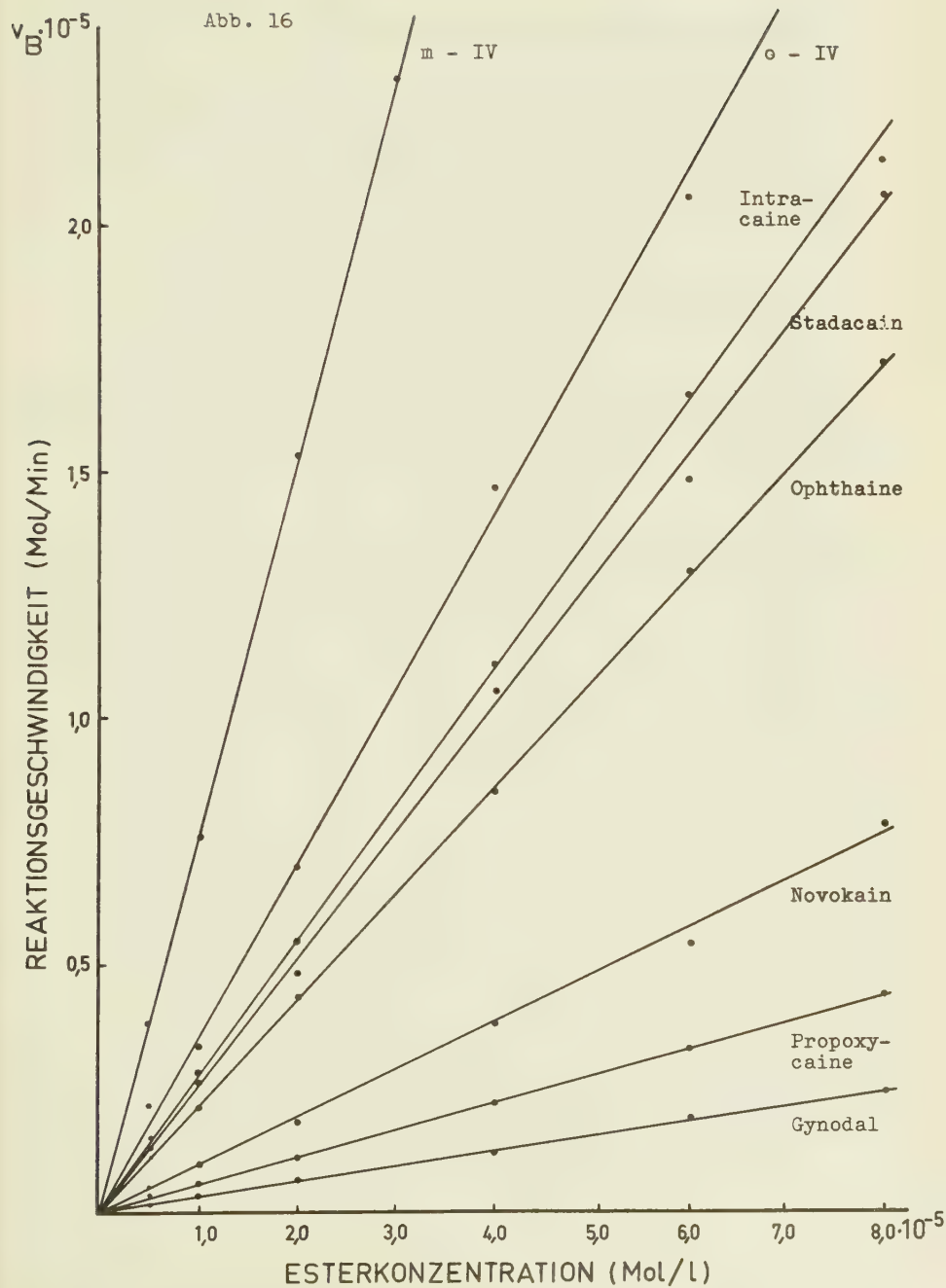
Die aus der Abnahme der Anfangsgeschwindigkeiten errechneten Hydrolysegeschwindigkeiten v_B für verschiedene Esterkonzentrationen sind in Tabelle VI zusammengefaßt, soweit mit den eingehaltenen Versuchsbedingungen eine Bestimmung möglich war (vgl. 3.3.4.2).

Tabelle VI

Name bzw. Verb. Nr.	v_B (10^{-5} Mol/Min.)						Wellen- länge (mp)
	Konzentration (10^{-5} Mol/l)						
	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	
Tutocain	0,006	0,013	0,024	0,052	-	-	305
Gynodal	0,016	0,033	0,057	0,120	0,185	0,244	320
Surfacaine	(0,061)	(0,095)	0,064	0,140	0,179	0,244	270
Larocain	0,015	0,039	0,081	0,153	0,237	0,288	310
Propoxycaine	0,031	0,056	0,107	0,220	0,324	0,432	310
Sympocaine	0,029	0,062	0,115	0,260	0,334	0,464	315
Pantocain	0,036	0,069	0,141	0,276	0,400	0,450	315
Butacaine	0,036	0,078	0,145	0,290	0,455	0,555	305
Cornecain	0,050	0,103	0,177	0,354	0,510	0,652	310
Novokain	0,044	0,093	0,180	0,380	0,540	0,785	310
Novesin	0,059	0,101	0,222	0,460	0,610	0,875	310
Ophthaine	0,115	0,208	0,435	0,845	1,300	1,72	310
Stadacain	0,132	0,264	0,484	1,06	1,49	2,07	280
Intracaine	0,149	0,280	0,540	1,11	1,66	2,14	280
Metycaine	0,300	0,645	1,15	2,56	3,39	5,26	245
o - I	0,236	0,406	0,770	1,57	2,29	3,14	245
m - I	0,375	0,840	1,60	3,30	5,18	6,55	245
p - I	0,156	0,294	0,610	1,28	1,75	2,39	275
o - II	0,156	0,380	0,730	1,42	2,15	2,66	245
m - II	0,375	0,765	1,56	3,17	4,71	6,80	245
p - II	0,149	0,269	0,540	1,07	1,62	2,02	275
o - III	0,152	0,376	0,710	1,41	2,04	2,64	245
m - III	0,350	0,745	1,55	3,08	4,48	6,36	245
p - III	0,130	0,260	0,520	1,02	1,59	1,97	275
o - IV	0,214	0,334	0,695	1,47	2,06	2,72	245
m - IV	0,380	0,750	1,53	2,90	4,45	6,10	245
p - IV	0,154	0,291	0,500	1,04	1,45	1,90	275
o - V	0,250	0,406	0,869	1,54	2,23	3,02	245
m - V	0,404	0,801	1,64	3,52	5,15	7,45	245
p - V	0,149	0,304	0,636	1,20	1,63	2,22	275
p - VI	0,125	0,286	0,545	1,14	1,48	2,14	275

Die Substratkonzentration-Reaktionsgeschwindigkeitskurven erhält man, wenn die Anfangsgeschwindigkeiten v_B in Abhängigkeit von den korrespondierenden Substratkonzentrationen aufgetragen werden. Wie zu erwarten war, erhält man eine Gerade. (Abbildung 16). Die aus dem Rahmen fallenden Werte für die beiden niedrigsten gemessenen Surfacaine-Konzentrationen konnten nicht erklärt werden.

Abb. 16



3.3.4.1 Die Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten

Die Ermittlung der Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten k erfolgte nach einer von A. V. W i l l i (152) für Novokain und Novesin angegebenen Methode (vgl. 4.3.4). Ihre Werte für die verschiedenen L.A. und ACBE sind in Tabelle VII wiedergegeben.

Tabelle VII

Verbindung	$k \text{ (sec}^{-1} \text{)}$	Verbindung	$k \text{ (sec}^{-1} \text{)}$
Tutocain	$2,06 \cdot 10^{-4}$	o - I	$9,10 \cdot 10^{-3}$
Gynodal	$5,45 \cdot 10^{-4}$	m - I	$2,76 \cdot 10^{-2}$
Surfacaine	$5,90 \cdot 10^{-4}$	p - I	$6,60 \cdot 10^{-3}$
Larocain	$6,74 \cdot 10^{-4}$	o - II	$7,85 \cdot 10^{-3}$
Propoxycaine	$1,09 \cdot 10^{-3}$	m - II	$2,57 \cdot 10^{-2}$
Sympocaine	$1,14 \cdot 10^{-3}$	p - II	$6,49 \cdot 10^{-3}$
Pantocain	$1,38 \cdot 10^{-3}$	o - III	$7,44 \cdot 10^{-3}$
Butacaine	$1,54 \cdot 10^{-3}$	m - III	$2,21 \cdot 10^{-2}$
Cornecain	$1,95 \cdot 10^{-3}$	p - III	$6,20 \cdot 10^{-3}$
Novokain	$2,00 \cdot 10^{-3}$	o - IV	$7,17 \cdot 10^{-3}$
Novesin	$2,46 \cdot 10^{-3}$	m - IV	$2,14 \cdot 10^{-2}$
Ophthaine	$5,20 \cdot 10^{-3}$	p - IV	$5,95 \cdot 10^{-3}$
Stadacain	$6,15 \cdot 10^{-3}$	o - V	$7,45 \cdot 10^{-3}$
Intracaine	$6,60 \cdot 10^{-3}$	m - V	$2,59 \cdot 10^{-2}$
Metycaine	$1,40 \cdot 10^{-2}$	p - V	$6,50 \cdot 10^{-3}$
		p - VI	$2,73 \cdot 10^{-3}$

3.3.4.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

In Übereinstimmung mit der enzymkatalysierten Esterhydrolyse werden die 4-Amino- (Novokain - Reihe), bzw. 4-Alkaminester (Pantocain - Reihe) langsamer gespalten als die 4-Alkoxyverbindungen (Stadacain - Reihe) und diese wieder langsamer als der einfache Benzoessäureester Metycaine. Eine Ausnahme bildet wieder Surfacaine, dessen Spaltbarkeit in alkalischem Milieu gegenüber Novokain noch geringer geworden ist (0,36 : 1). Die Hydrolysengeschwindigkeiten von Cyclaine und Stovaine konnten nicht exakt bestimmt werden, da trotz des großen Laugenüberschusses der Abbau äußerst langsam erfolgte (langsamer als bei Tutocain). Das gleiche gilt für die 2-Oxy-4-amino-, bzw. 2-Oxy-4-alkaminester Oxyprocain und Salicain. Der Grund dürfte in der Bildung ihrer Phenolate zu suchen sein. Die PAB-Ester folgen den für diese Körperklasse aufgefundenen Beziehungen, d.h. die Hydrolysengeschwindigkeit nimmt mit linear wachsender Kettenlänge, sowie vom primären über den sekundären zum tertiären Aminoalkohol ab (7,153). Die von C. R o h m a n n und H. R i t s e r t (12) für die AOB-E aufgefundene und in dieser Arbeit bestätigte Regel, daß mit linear wachsender Alkoxykette, unabhängig vom Substitutionsort, die Spaltungsgeschwindigkeit abnimmt, trifft nicht auf Propoxycaine und Sympocaine zu, die außer der 2-n-Propoxy, bzw. 2-n-Butoxygruppe in 4-Stellung die kernständige, primäre Aminogruppe besitzen. Hier nimmt von der Propoxy- zur Butoxyverbindung die Hydrolysengeschwindigkeit in Übereinstimmung mit der enzymatischen Spaltung, zu. Pantocain verseift alkalisch langsamer als Cornecain, verhält sich also umgekehrt wie in Gegenwart von Serum. Es scheint, daß hier der Einfluß des Säurerestes den des Alkohols überwiegt. Der sowohl beim Abbau durch Enzym, als auch durch Alkali bei den AOB-E festgestellte Zusammenhang einer Hydrolysegeschwindigkeitszunahme durch Verschiebung des Alkoxy substituenten von o nach m ist auch bei gleichartiger Verschiebung des o-n-Butoxy substituenten im PAB-Ester (Sympocaine-Novesin) zu beobachten.

Ophthaine ordnet sich im Gegensatz zu seiner Enzymspaltung nicht in die Reihe der homologen 4-Alkoxyverbindungen ein, denn seine Hydrolyse durch Alkali erfolgt deutlich langsamer als bei diesen.

Wie erwartet zeigt sich Metycaine als einfacher Benzoesäureester eines primären Alkohols in der hier aufgeführten Reihe der L.A. am wenigsten stabil.

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bewegen sich zwischen $2,06 \cdot 10^{-4}$ für Tutocain und $1,40 \cdot 10^{-2}$ für Metycaine parallel zu den Verseifungsgeschwindigkeiten.

Wie aus Tabelle VI weiter hervorgeht, entspricht das Verhalten der stellungsisomeren AOBEE dem ihrer enzymkatalysierten Hydrolyse, d.h. die größten Spaltungsgeschwindigkeiten weisen stets die m-Verbindungen auf, gefolgt von den o-Verbindungen, während die p-Derivate am langsamsten gespalten werden. H. R i t s e r t (12), der für diese, von ihm synthetisierten Körper die alkalische Hydrolysegeschwindigkeit nach einer anderen Methode bestimmte, kam zu dem gleichen Ergebnis. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren, mit dem nicht die Zeit einer 50 %igen Hydrolyse, sondern die Anfangsgeschwindigkeit der Esterspaltung gemessen wurde, läßt darüber hinaus den Schluß zu, daß innerhalb der untersuchten, homologen AOBEE die Stellungsänderung des Alkoxysubstituenten am Benzolkern einen quantitativen Einfluß auf die Abbaugeschwindigkeit ausübt.

Innerhalb der untersuchten Konzentrationen ist das Verhältnis: $v_{B(o)} : v_{B(m)} : v_{B(p)}$ für alle Verbindungen mit unverzweigter Alkoxykette weitgehend konstant und beträgt im Mittel 1 : 2,15 : 0,75 .

Die von obigem Autor (12) gefundenen Beziehungen in den homologen Reihen stimmen mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen insofern überein, daß mit linearer Kettenverlängerung eine stetige Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit verbunden ist. Die i-Propoxyverbindungen wurden schneller hydrolysiert als die n-Propoxyverbindungen (vgl. Tab.VI),

ebenso wie das von den i-Butoxyverbindungen untersuchte p-Derivat schneller gespalten wurde als der n-Butoxybenzoesäureester. Das Verhalten der i-Propoxyverbindungen weicht als einziges von dem von H. Ritsert gefundenen ab. Die Geschwindigkeitskonstanten verhalten sich analog den Hydrolysegeschwindigkeiten v_B .

3.3.5 Enzymkatalysierte Hydrolyse und Absorptionsspektren

Die Frage welche innermolekularen Beeinflussungen durch die verschiedenen Substituenten im Zusammenhang mit der enzymatischen Hydrolyse stehen, beantworten R. M. L e v i n e und B. B. C l a r k (148) mit dem Einfluß auf die Polarisationsmöglichkeiten im Molekül durch die Elektronenkonfiguration des betreffenden Substituenten. Am Beispiel des Novokains (I) und des 4-Fluorbenzoesäure- β -diäthylaminoäthylesters (II) zeigten sie, daß durch die in I erfolgte Einführung der kernständigen Aminogruppe und der damit verbundenen Erleichterung der Elektronendelokalisation, die Spaltungsgeschwindigkeit durch menschliches Serum in vitro im Vergleich zu II erheblich kleiner ist.

Hiervon ausgehend könnte man nach einer Beziehung zwischen der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit und den UV-Spektren der entsprechenden L.A. suchen, denn diese werden ja durch die Resonanzverhältnisse im Molekül charakteristisch beeinflusst (vgl. 3.3.2).

In der Reihenfolge: Benzoesäureaminoester (Metycaine) - 4-Alkoxybenzoesäureester (Stadacainreihe) - PAB-Ester (Novokainreihe) ist mit abnehmender enzymatischer Hydrolysegeschwindigkeit eine zunehmende Rotverschiebung der 1.Hauptbande zu beobachten. Ähnliches gilt innerhalb der Gruppe der 2-Oxy- und 2-Alkoxy-4-amino-, bzw. 2-Alkoxy-4-alkaminbenzoesäureester, denn die 1.Hauptbande der Spektren von Salicain und Gynodal ist mehr bathochrom verschoben, als die der schneller hydrolysierenden Verbindungen Oxyprocain, Propoxycaine, Sympocaine und Novesin. (Vgl. Tabellen II und V).

Die p-Derivate der AOBÉ, die durchweg langsamer gespalten werden als die o- und m-Verbindungen, haben ihr Maximum bei durchschnittlich 260 m μ , die Maxima der letzteren liegen bei 240 m μ .

Wie unter 3.3.2 beschrieben wurde, ist die bathochrome Verschiebung der 1. Hauptbande eine Folge der erleichterten π -Elektronendelokalisation innerhalb des Estermoleküls, beeinflusst durch den verschieden stark ausgeprägten elektronenabgebenden bzw. elektronenaufnehmenden Charakter der eingeführten Substituenten. Für die oben erwähnten Verbindungen gilt also, daß mit fortschreitender Abnahme der Energie, die für die Elektronendelokalisation aufgewendet werden muß, ebenfalls eine Abnahme der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit zu beobachten ist. Es ist beabsichtigt diese Beziehungen in weiteren Arbeiten genauer zu untersuchen.

3.3.6 Enzymkatalysierte Hydrolyse und lokalanästhetische Wirkung

Der Vergleich der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit mit der lokalanästhetischen Wirkung der in Tabelle III aufgeführten gebräuchlichen L.A. ist insofern problematisch, als einmal ihr Verwendungszweck nicht einheitlich ist, (Leitungs-, Infiltrations- und Oberflächenanästhesie) und außerdem infolge der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden der verschiedenen Forscher für die Mehrzahl der Verbindungen keine einheitlichen Versuchsreihen vorliegen. Es ist bekannt, daß alle in Tabelle I aufgeführten Verbindungen, unabhängig von ihrem praktischen Anwendungsgebiet eine mehr oder weniger starke oberflächenanästhetische Wirkung ausüben. Darüber liegen umfangreiche Untersuchungen an der Cornea vor. Arbeiten von F. H e r r und Mitarbeitern (154), C. R o h m a n n und G. H e i l (155), W. L a u b e n d e r und L. H u n n (156), u.a., die sich mit der Aufklärung von Zusammenhängen zwischen Wirkung und physikalisch-chemischen Eigenschaften von L.A. befass-

ten, lassen erkennen, daß vor allem Adsorbierbarkeit, Diffusionsvermögen und Oberflächenspannung eine große Rolle spielen und bei den untersuchten Verbindungen zu befriedigenden Ergebnissen geführt haben. Interessant ist, daß z.B. im Auge von Mensch und Rind Cholinesterase nachgewiesen werden konnte (157). Damit erhebt sich die Frage, ob außer den angeführten physikalisch-chemischen Eigenschaften auch mit einer enzymatischen Beeinflussung der eingebrachten L.A. zu rechnen ist.

W. K e i l und E. R a d e m a c h e r (158) berichten in mehreren Arbeiten über die Anästhesiedauer einiger L.A. an der Kaninchencornea. Stellt man sie in der Reihenfolge der ansteigenden Wirkungsdauer zusammen, erhält man folgendes Bild:

Novokain < Oxyprocain < Sympocaine < Salicain < Pantocain < Novesin.

Eine Bestätigung dieser Reihenfolge ergibt sich aus einer Mitteilung von P. P. K o e l z e r und K. H. W e h r (159), für die von ihnen untersuchten Verbindungen Novokain, Oxyprocain, Salicain und Pantocain. Metycaine zeigte sich bezüglich der Wirkungsdauer dem Oxyprocain etwas überlegen. Mehrere Veröffentlichungen von F. P. L u d u e n a und Mitarbeitern (160-165) befassten sich mit der l.a.)¹ Aktivität homologer Reihen von 2-Oxy- bzw. 2-Alkoxy-4-aminobenzoesäure- β -diäthylaminoäthylestern. Mit Anwachsen der Alkoxy-Seitenkette von Methoxy- zu Butoxy- ging eine Aktivitätszunahme parallel. Im Vergleich zu Pantocain steigt die Aktivität in der Reihenfolge: Novokain < Propoxycaine < Sympocaine < Pantocain. Sie stimmt mit den oben angegebenen Reihen der Wirkungsdauer überein.

Von diesen L.A. wird Novokain durch menschliches Blutserum am schnellsten abgebaut, alle anderen langsamer, aber außer diesem läßt sich kein Zusammenhang finden. Vor allem die gute Wirkung des Metycaines und Novesins steht im völligen Gegensatz zu ihrer großen Hydrolysegeschwindigkeit.

Auf Grund einer kürzlich erschienenen Arbeit, in der

)¹ l.a. = lokalanästhetisch

W. L a u b e n d e r und L. H u n n (156) die von C. R o h m a n n und H. R i t s e r t (12) synthetisierten Körper u.a. auf ihre oberflächen- und leitungsanästhetische Wirkung untersuchten, war es möglich, einen lückenlosen Vergleich zwischen ihrer Wirkung bzw. Wirkungsdauer und der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit anzustellen. Die Anästhesiedauer an der Kaninchencornea ist dabei als die Zeit definiert, die vom Erreichen des Grenzwertes der Anästhesie bis zum Wiederabsinken auf diesen Wert vergeht.

Bei allen Verbindungen nahm die Anästhesietiefe und die Wirkungsdauer in der Reihenfolge $0 < m < p$ zu. Da V_E aber in der Reihenfolge $m > o > p$ abnimmt, besteht auch hier keine Beziehung zur Hydrolysegeschwindigkeit.

Übereinstimmt lediglich die Tatsache, daß die p-Verbindungen, die die längste Wirkungsdauer besitzen auch die größte Stabilität gegenüber der Esterase aufweisen.

Innerhalb der homologen Reihen nimmt die Wirkungsintensität und die Wirkungsdauer von der Methoxy- zu der n-Butoxyverbindung zu. Aus den in Tabelle V gemachten Angaben ist ersichtlich, daß sich keine Beziehung zu V_E herstellen läßt, daß sich im Gegenteil z.B. in der Reihe der p-Verbindungen eine entgegengesetzte Parallelität ergibt.

Die alkalische Hydrolysegeschwindigkeit dagegen läßt innerhalb der Kettenhomologen einen gewissen Zusammenhang erkennen, da mit ihrer Abnahme sowohl eine Steigerung der Wirkung als auch der Wirkungsdauer verbunden ist. Die Diskrepanz, die die oben erwähnten Autoren (156) bezüglich der i-Propoxy-Verbindungen feststellten, fällt nach den in dieser Arbeit für diese Verbindungen gefundenen alkalischen Hydrolysegeschwindigkeiten weg, so daß von einer durchgehenden Parallelität gesprochen werden kann. Es ist jedoch nicht möglich von der Reaktionsgeschwindigkeit her quantitative Aussagen über die Wirkungsdauer zu machen.

Die getroffenen Feststellungen gelten auch für das leitungsanästhetische Verhalten der AOB, die bei geringerer

Aktivität, die gleichen Zusammenhänge zwischen Konstitution und Wirkung erkennen lassen wie bei der Oberflächenanästhesie und keine Beziehung zum enzymkatalysierten Abbau der Ester haben.

Das zusammenfassende Ergebnis kann man dahingehend interpretieren, daß, wie eingangs erwähnt, für die untersuchten Verbindungen die enzymatische Esterhydrolyse im Zusammenhang mit ihrer oberflächen- und leitungsanästhetischen Wirkungsdauer nicht von Bedeutung sein kann, sondern mit grosser Wahrscheinlichkeit die ebenfalls von den Substituenten abhängige Oberflächenspannung und die damit verbundene Adsorbierbarkeit der gelösten Stoffe, dafür in Frage kommt. (154,156).

	Seite
4 <u>Experimenteller Teil</u>	87
4.1 Aufnahme der Absorptionsspektren	87
4.2 Die Untersuchung der enzymkatalysierten Esterhydrolyse	88
4.2.1 Versuchsmaterial	88
4.2.2 Arbeitsverfahren	90
4.2.3 Die Bestimmung der Hydrolysen- geschwindigkeit v_E	92
4.2.4 Die Aktivität des Serums	94
4.2.5 Die Aktivität der Esterase	95
4.2.6 Einfluß der Serumkonzentration auf die Hydrolysen-geschwindigkeit	96
4.2.7 Die Bestimmung der Michaeliskonstanten	96
4.3 Die Untersuchung der hydroxylionenkata- lysierten Esterhydrolyse	101
4.3.1 Versuchsmaterial	101
4.3.2 Arbeitsverfahren	101
4.3.3 Die Bestimmung der Hydrolysenge- schwindigkeit v_E	102
4.3.4 Die Bestimmung der Hydrolysen-geschwindig- keitskonstanten k	105

4 Experimenteller Teil

4.1 Aufnahme der Absorptionsspektren

Zur Durchführung der Versuche stand ein DU Spektrofotometer mit UV - Zusatz der Fa. Beckman, Pasadena, USA, zur Verfügung.

Alle untersuchten Substanzen waren als Hydrochloride, bzw. in einem Fall als Sulfat, leicht wasserlöslich. In wässriger Lösung wurden auch ihre Absorptionsspektren gemessen. Zur Aufnahme der L.A.- Lösungen dienten Quarzküvetten mit einem Lichtweg von 1,000 cm. Genau $6 \cdot 10^{-3}$ Mol des betreffenden Esters wurden auf einer Halbmikrowaage gewogen und in einem geeichten 100 ml Meßkölbchen in muldestilliertem Wasser gelöst. In die Meßküvette wurden zu 3 ml Wasser mit Hilfe einer Mikrometerspritze 0,01 ml der Lösung eingebracht und vorsichtig, unter Vermeidung von Luftblasen umgeschüttelt. Die Endkonzentration an L.A. betrug $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l.

Nach Vorversuchen wurde sie deshalb gewählt, weil die Extinktionen der aufzunehmenden Spektren dann innerhalb eines optimalen Meßbereiches des Instrumentes lagen. Als Bezugslösung diente eine Küvette mit muldestilliertem Wasser. In einem Bereich von 210 - 320 mμ wurden die Extinktionen in Abständen von 5 mμ, bei Maxima in Abständen von 1 mμ abgelesen. Das Einhalten eines geringeren Intervalls war nicht notwendig, da in wässriger Lösung nicht mit einer Feinstruktur der Spektren gerechnet werden muß. Die Messungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt, wobei bei keiner der untersuchten Substanzen eine feststellbare Hydrolyse innerhalb der für die Aufnahme der Spektren benötigten Zeit beobachtet wurde. Wiederholte Messungen mit verschiedenen Substanzen ergaben, daß die Extinktionen mit einer Genauigkeit von 1% reproduziert werden konnten. Sie lag damit innerhalb der vom Gerätehersteller angegebenen Fehlergrenze.

Zur grafischen Darstellung der Extinktionskurven, wurde der molare Extinktionskoeffizient ϵ gegen die entsprechende Wellenlänge in mμ aufgetragen.

4.2 Die Untersuchung der enzymkatalysierten Esterhydrolyse

4.2.1 Versuchsmaterial

Serum

Die Versuche an den gebräuchlichen L.A., mit Ausnahme von Surfacaine, Metycaine, Stadacain und Intracaine wurden mit "Serumkonserve Behringwerke" durchgeführt, einem sterilen Präparat, das in 100 ml das Serum von etwa 200 ml menschlichem Frischblut enthält. Es ist frei von Konservierungsmitteln, pathogenen Keimen, Protozoen und Virusarten. Durch Entfernung der nicht lösungsstabilen Serumbestandteile treten innerhalb der Konserve keine Trübungen auf (166). Bei Bedarf wurde einer frisch geöffneten Ampulle mittels einer sorgfältig gereinigten, trockenen Pipette die gewünschte Menge entnommen. Angebrochene Ampullen wurden nicht länger als zwei Tage bei 2°C, luftdicht verschlossen aufbewahrt.

Die kleinste Wellenlänge, bei der bei großer Spaltbreite (1,9 mm) die Intensität des austretenden Lichtstrahls noch genügend groß war eine Messung zuzulassen, variierte mit der Serumverdünnung von 285 mp bei einer Serumendkonzentration von 6,7 % bis 297 mp bei einer Endkonzentration von 40 %. Durch diese optischen Eigenschaften bedingt, konnten also nur die Verbindungen mit Serum direkt hydrolysiert werden, die oberhalb von 290 mp noch eine signifikante Absorption aufwiesen.

Gereinigte Serumesterase

Alle AOB, sowie Surfacaine, Metycaine, Stadacain und Intracaine wurden der Hydrolyse durch gereinigte Serumesterase unterworfen. Die Herstellung erfolgte nach einer von W. K a l o w (31) angegebenen Methode, indem 10 ml der Serumkonserve zur Ausfällung optisch störender Eiweißstoffe mit dem gleichen Volumen einer gesättigten NaSO_4 - Lösung in einem Zentrifugengefäß unter Umschwenken tropfenweise versetzt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen wurden. Es bildete sich ein weißer, grobflockiger Nieder-

schlag, der hochtourig abzentrifugiert wurde, so daß er sich als kompakte, am Zentrifugengefäß festhaftende Masse absetzte. Die überstehende klare Flüssigkeit konnte ohne großen Verlust abgegossen und einer zweistündigen Dialyse gegen fließendes Leitungswasser unterworfen werden. Im Anschluß daran erfolgte eine achtstündige Dialyse gegen Phosphatpuffer. Ein von dem erwähnten Autor (31) beobachteter, hierbei auftretender, am Dialysierschlauch festhaftender Niederschlag, zeigte sich bei fünfzehn Ansätzen nur einmal. K. J. N e t t e r (145) erhielt bei keinem seiner Versuche einen derartigen Niederschlag. Bei der Aktivitätsbestimmung wurde bei diesem Präparat kein Unterschied im Vergleich zu den anderen Chargen festgestellt.

Die nach der Dialyse gewonnene, wasserhelle, völlig klare Lösung, war das als "gereinigte Serumesterase" bezeichnete Präparat, das für die Versuche nicht länger als drei Tage luftdicht verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

Durch die Reinigung wurden die optischen Eigenschaften gegenüber dem Ausgangsprodukt bedeutend verbessert. Bei einer Spaltbreite von 1,9 mm konnten mit einer Esteraseverdünnung, die einer Serumendkonzentration von 3,33 % entsprach, noch bei 235 m μ Messungen durchgeführt werden. (Entsprechend 240 m μ bei 6,7 % und 270 m μ bei 13,3 %).

Pufferlösung

Für alle Versuche diente eine $\frac{M}{15}$ Phosphatpufferlösung mit einem pH 7,35 nach S.P.L. S ö r e n s e n (167). (In dieser Arbeit der Einfachheit halber als Phosphatpuffer bezeichnet). Er wurde benutzt zur Dialyse bei der Herstellung der Esterase, zur Verdünnung des Serums auf die gewünschte Versuchskonzentration und als Puffer bei den Versuchen selbst. Seine Wasserstoffionenkonzentration wurde mittels einer Glaselektrode (Einstabmeßkette der Fa. Ingold) in Verbindung mit einem pH - Meter der Fa. Knick kontrolliert. Der Phosphatpuffer hat den Vorteil innerhalb des für die Messungen in Frage kommenden UV - Bereiches nur eine geringe Absorption zu zeigen, die die Messungen nicht beeinträchtigt.

4.2.2 Arbeitsverfahren

Von den jeweils untersuchten Verbindungen wurden auf der Halbmikrowaage genau $6 \cdot 10^{-3}$ Mol abgewogen, quantitativ in ein geeichtes 100 ml Meßkölbchen gespült, in muldestilliertem Wasser gelöst und bis zur Marke aufgefüllt. Je nach Versuchsbedingung wurde einer Ampulle Serum in Mengen zwischen 1 und 6 ml entnommen und mit Phosphatpuffer auf 10 ml aufgefüllt. Serumverdünnungen und Phosphatpuffer wurden in getrennten Gefäßen zusammen mit den Pipetten, die der Entnahme dienen sollten, in einem Thermostaten auf $37,7^{\circ}\text{C}$ gebracht. Diese Temperatur ergab sich durch den Ausgleich des Temperaturverlustes vom Thermostaten zum Küvettengehäuse, in dem die zu den Versuchen benützten Küvetten auf die Versuchstemperatur von $37,0^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ eingestellt wurden. Gleichzeitig konnte damit ein Temperaturabfall während des Einpipettierens der Lösungen in die Küvetten etwas ausgeglichen werden.

Die Küvetten waren untereinander ausgemessen, die Schichtdicke der aufzunehmenden Lösung betrug darin genau 1,000 cm. Ein Teil der L.A.- Lösung wurde in eine Mikrometerspritze aufgezogen und bis zu Versuchsbeginn bei Zimmertemperatur aufbewahrt. In beide Küvetten wurden zunächst 2 ml Serumverdünnung und 1 ml Phosphatpuffer einpipettiert und unter Vermeidung von Luftblasen vorsichtig gemischt. Zur Gewährleistung der genauen Versuchstemperatur wurden sie zunächst wieder in den Halter eingesetzt. Nach etwa 5 Minuten wurde dann durch Zugabe der gewünschten Menge Ester in die Meßküvette und vorsichtiges Umschütteln, die Reaktion gestartet. Der Zeitpunkt der unmittelbar erfolgenden ersten Messung wurde mit $t = 0$ angesetzt. Je nach der Spaltungsgeschwindigkeit der Verbindung, erfolgten zu Beginn die Extinktionsmessungen in Abständen von 30 - 60 Sekunden. Mit fortschreitender, d.h. langsamer werdender Reaktion alle 2 - 5 Minuten. Die Hydrolyse wurde als beendet angesehen, wenn sich die Endextinktion innerhalb eines Zeitraumes von 15 Minuten nicht mehr veränderte.

Die untersuchten L.A.- Konzentrationen folgten bei den

Versuchsbedingungen mit hinreichender Genauigkeit dem Bouguer - Lambert - Beer'schen Gesetz. Die Extinktionen waren also in jedem Punkt der Kurve proportional der Esterkonzentration.

Zu Beginn und am Ende des Versuches wurde mittels einer Spezialelektrode der Fa. Ingold, die das Messen in sehr kleinen Volumina gestattet und einem Röhrenvoltmeter der Fa. Knick der pH-Wert unter Berücksichtigung der Versuchstemperatur bestimmt. Aktivitäten wurden außerachtgelassen. Bei keinem der Versuche veränderte sich der pH-Wert wesentlich, die maximale Abweichung betrug $7,35 \pm 0,05$. Dadurch waren Spektralverschiebungen ausgeschlossen, wie sie durch pH - Änderungen hervorgerufen werden können (31).

In Übereinstimmung mit W. K a l o w (31) war es ohne Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit, ob sich die Meßlösung ständig im UV-Strahlengang des Instrumentes befand, oder nur für die kurze Zeit einer Messung. Die Versuchsergebnisse waren ebenfalls unabhängig davon, ob während der Reaktion die Küvetten öfter vorsichtig umgeschüttelt, oder unbewegt im Halter belassen wurden.

Nach Beendigung der Messungen erfolgte in der Reaktionslösung die Bestimmung der Spektren der Spaltprodukte, von denen ausschließlich die entstandenen Säuren interessierten. (Vgl. 3.3.2). Sie wurden mit den Spektren der reinen Benzoesäure, PAB, oder den durch die alkalischen Hydrolysen erhaltenen substituierten Benzoesäuren, bzw. substituierten 4-Aminobenzoesäuren verglichen (3.3.2).

Gleichzeitig mit den Hauptversuchen wurden Kontrollversuche durchgeführt, in denen die Spaltung der Ester in reinem Phosphatpuffer untersucht wurde. Dabei erwiesen sich die gebräuchlichen L.A., sowie die 4-Alkoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthylester über einen längeren Zeitraum als sehr unempfindlich, während die meisten o- und m-AOBE sich weniger stabil zeigten. Die Versuchsdauer war jedoch so gewählt, daß der Einfluß des Puffers weitgehend unberücksichtigt bleiben konnte.

Bei der Bestimmung der Esterhydrolyse mit Esterase ist das Verfahren das gleiche, nur, daß an Stelle der Serumverdünungen die entsprechenden Esteraselösungen treten.

4.2.3 Bestimmung der Hydrolysengeschwindigkeit v_E

In Tabelle VIII ist am Beispiel des Novokains die Berechnung von v_E durchgeführt. Die Novokainkonzentration ist $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, die Serumendkonzentration in der Küvette beträgt 20 %.

Nach dem Einarbeiten in die Methode vergingen zwischen Zugabe des L.A. (Reaktionsbeginn) und Ablesen des ersten Extinktionswertes nicht mehr als 15 Sekunden, so daß nur eine geringfügige Korrektur der Anfangsextinktion nötig war.

Tabelle VIII

Novokainkonzentration	: $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/L
Serumendkonzentration	: 20 %
Phosphatpuffer $\frac{M}{15}$	: pH 7,35
Wellenlänge	: 310 mμ
Versuchstemperatur	: $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
pH des Reaktionsgemisches zu Beginn des Versuches	: 7,35
pH des Reaktionsgemisches nach Beendigung des Ver- suches	: 7,35

Zeit t(sec)	Extinktion E	Extinktions- differenz	Mittelwert
0	0,205	0,015	
60	0,190	0,014	
120	0,176	0,016	
180	0,160	0,016	
240	0,144	0,019	
300	0,125	0,016	0,0155
360	0,109	0,016	
420	0,093	0,015	
480	0,078	0,014	
540	0,064	0,014	
600	0,050		
660	0,041		
720	0,033		
780	0,027		
840	0,022		
900	0,019		
...	...		
1200	0,014		

Der Extinktionsbereich $E_0 - E_{\infty}$ (0,205 - 0,014) entspricht der Gesamtmenge des eingesetzten Esters, also $2 \cdot 10^{-5}$ Mol. Die Extinktionsdifferenzen sind während der ersten 10 Minuten konstant, der Mittelwert beträgt 0,0155. Ihm entspricht also eine Novokainkonzentration von :

$$\frac{2 \cdot 10^{-5} \cdot 0,0155}{(0,205 - 0,014)} = 0,162 \cdot 10^{-5} \text{ Mol}$$

Da die maximale Anfangsgeschwindigkeit definiert ist durch diejenige Menge an L.A., die unter den angegebenen Versuchsbedingungen, zu Beginn der Reaktion innerhalb einer Minute hydrolysiert werden kann, ist im angeführten Beispiel

$$v_E = 0,162 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/Min.}$$

4.2.4 Die Aktivität des Serums

Im Verlauf der Untersuchungen wurden Ampullen aus drei verschiedenen Fabrikationschargen (hier mit A, B, C bezeichnet) verbraucht, d.h., daß an Hand einer Substratstandardlösung die Aktivität dieser drei Sera festgestellt werden mußte. Darüber hinaus erfolgte eine Aktivitätskontrolle verschiedener Ampullen einer Charge, hier mit A₁.., B₁.., C₁.. bezeichnet.

Standardlösung war in allen Fällen eine $2 \cdot 10^{-5}$ molare Novokainlösung, die Serumendkonzentration stets 20 %.

In Tabelle IX sind die aus acht Versuchsansätzen ermittelten Hydrolysegeschwindigkeiten v_E angegeben.

Tabelle IX

Serum	v_E 10^{-5} Mol/Min	Abweichung vom Mittelwert	Fehler %
A ₁	0,162	0	0
A ₂	0,163	0,001	0,6
A ₃	0,169	0,007	4,3
B ₁	0,159	0,003	1,9
B ₂	0,162	0	0
B ₃	0,160	0,002	1,0
C ₁	0,162	0	0
C ₂	0,161	0,001	0,6
Mittelwert:	0,162	$\pm 0,002$	1,1

Die durchschnittliche Abweichung von $0,002 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min. entspricht einem mittlerem Fehler von 1,2 %. Der maximale Fehler beträgt 4,3 %. Die Aktivität der Sera, sowohl innerhalb der einzelnen Chargen, als auch der Chargen untereinander stimmt überraschend gut überein.

4.2.5 Die Aktivität der Esterase

Zur Bestimmung der Esteraseaktivität wurde als Standard ebenfalls eine $2 \cdot 10^{-5}$ molare Novokainlösung verwendet. Hydrolysiert wurde mit einer Esteraseverdünnung, die einer Serumendkonzentration von 6,7 % entsprach.

In Tabelle X sind die Hydrolysegeschwindigkeiten v_E , die mit aus acht verschiedenen Ansätzen stammenden Esterasepräparaten erhalten wurden, aufgeführt.

Tabelle X

Esterase	v_E 10^{-5} Mol/Min	Abweichung vom Mittelwert	Fehler %
1	0,055	0	0
2	0,054	0,001	1,8
3	0,055	0	0
4	0,057	0,002	3,6
5	0,054	0,001	1,8
6	0,057	0,002	3,6
7	0,053	0,002	3,6
8	0,055	0	0
Mittelwert:	0,055	$\pm 0,001$	1,8

Für v_E errechnet sich ein Mittelwert von $0,055 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min. Die durchschnittliche Abweichung von diesem Wert beträgt 0,001 Mol/Min. und entspricht einem mittlerem Fehler von 1,8 %. Der maximale Fehler ist 3,6 %.

Vergleicht man die erhaltene Geschwindigkeit mit derjenigen, die für die gleiche Konzentration mit Serum selbst erhalten wurde (vgl. 4.2.6) - sie beträgt: $v_E = 0,054 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min. - ergibt sich eine Übereinstimmung der Aktivitäten der in den Versuchen eingesetzten Enzympräparate.

4.2.6 Einfluß der Serumkonzentration auf die Hydrolysegeschwindigkeit

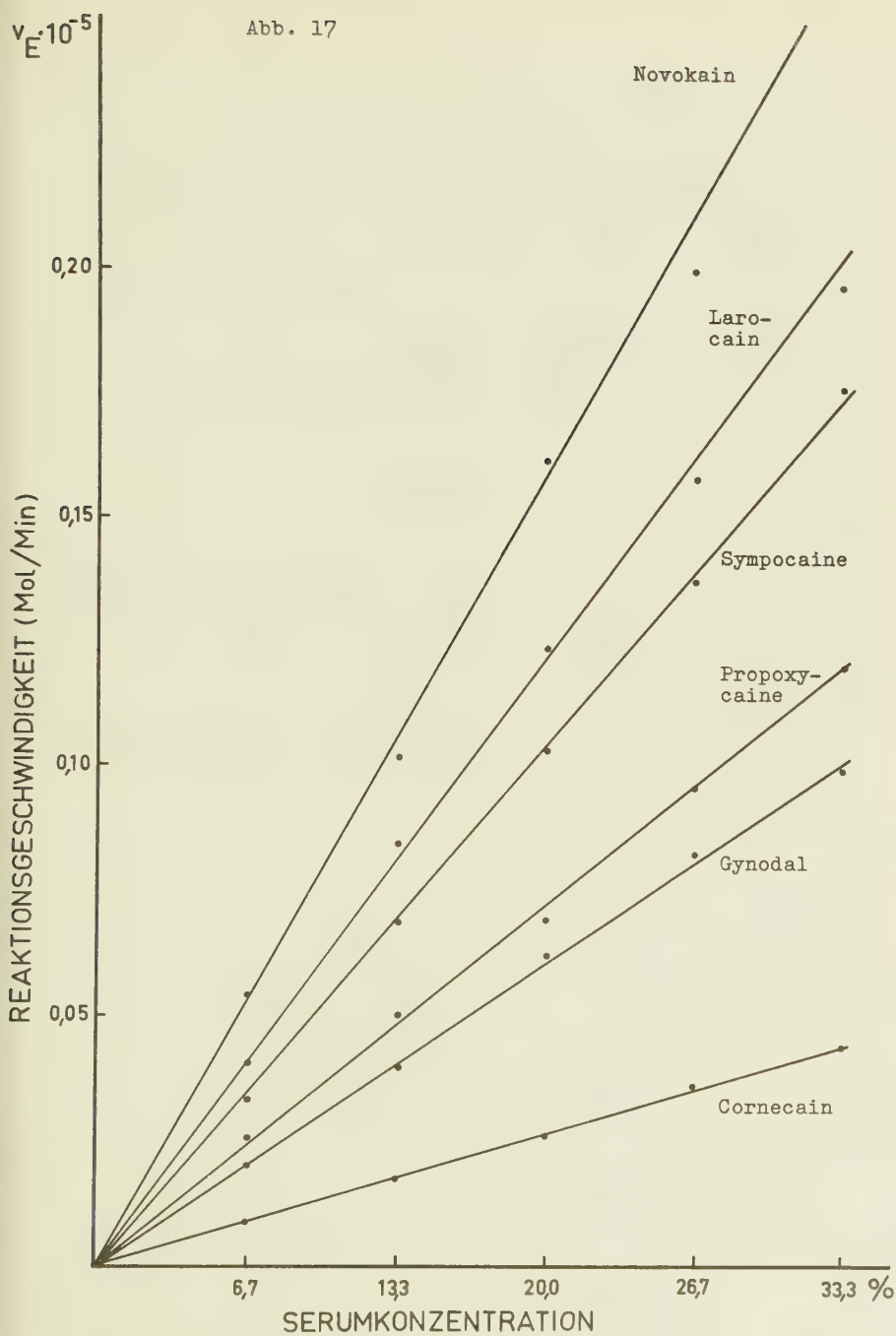
Für diese Versuche wurde bei konstanter Esterkonzentration ($2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l) die Konzentration der Serumverdünnungen variiert. Nach der unter 4.2.3 beschriebenen Methodik wurden zunächst mit Phosphatpuffer Serumverdünnungen von 10, 20, 30, 40 und 50 % hergestellt, deren Endkonzentrationen in der Küvette einem Gehalt von 6,7 , 13,3 , 20,0 , 26,7 und 33,0 % entsprachen.

In Abb. 17 sind die für einige L.A. ermittelten Hydrolysegeschwindigkeiten v_E in Abhängigkeit von der Serumkonzentration grafisch dargestellt. In allen Fällen erhält man eine Gerade. Die Erklärung ergibt sich aus den Katalysatoreigenschaften des für die Hydrolyse verantwortlichen Enzyms. (Vgl. 2,1.2). Während der Reaktion treten die Estermoleküle mit der Esterase kurzzeitig in einem ganzzahligen, einfachen Verhältnis zusammen (62). Die Zahl der beteiligten Substratmoleküle ist demnach von der zugesetzten Enzymmenge im Verhältnis einer direkten Proportion abhängig. Der Umsatz an Ester muß also linear mit der Esterasekonzentration zunehmen.

4.2.7 Die Bestimmung der Michaeliskonstanten

In einem Koordinatensystem wurden die reziproken Werte der Anfangsgeschwindigkeiten aus Tabelle III gegen die reziproken Werte der entsprechenden Substratkonzentrationen aufgetragen. Durch die, für die niedrigen Konzentrationen

Abb. 17



erhaltenen Punkte, läßt sich eine Gerade legen, deren Abschnitt auf der Ordinate die Maximalgeschwindigkeit V angibt, die theoretisch erreicht werden könnte, wenn keine Hemmung eintreten würde (vgl. 3.3.3). In der Lineweaver - Burk - Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} \quad \text{gibt} \quad \frac{K_m}{V} \quad \text{die Steigung der Geraden}$$

an. Es ist: $\operatorname{tg} \alpha = \frac{K_m}{V}$; K_m ist also bestimmt durch:

$$K_m = V \cdot \operatorname{tg} \alpha .$$

Da V und $\operatorname{tg} \alpha$ aus den experimentellen Ergebnissen grafisch bestimmt werden können (Abb. 18), läßt sich K_m auf einfache Weise berechnen. Ihre Werte sind für alle untersuchten Verbindungen in Tabelle IV zusammengefaßt.

Die Werte für die in Abb. 18 am Beispiel der Verbindungen o - IV und m - IV durchgeführte Bestimmung von K_m finden sich in Tabelle XI.

Tabelle XI

Verb. Nr.	[S] (10^{-5} Mol/l)	v_E (10^{-5} Mol/Min)	$\frac{1}{[S]}$	$\frac{1}{v_E}$
o - IV	0,25	0,470	4,10	2,14
	0,50	0,690	2,00	1,45
	1,0	0,900	1,00	1,11
	2,0	1,05	0,50	0,95
	4,0	1,14	0,25	0,88
	6,0	1,16	0,167	0,86
	8,0	1,11	0,125	0,90
m - IV	0,25	0,400	4,00	2,50
	0,50	0,770	2,00	1,30
	1,0	1,36	1,00	0,74
	2,0	2,25	0,50	0,45
	4,0	2,98	0,25	0,34
	6,0	2,90	0,167	0,34
	8,0	2,82	0,125	0,35

$$o - IV : \frac{1}{v} = 0,78 \cdot 10^5, \quad v = 1,28 \cdot 10^{-5}$$

$$\operatorname{tg} \alpha = 0,33 \cdot K_m = 0,33 \cdot 1,28 \cdot 10^{-5}$$

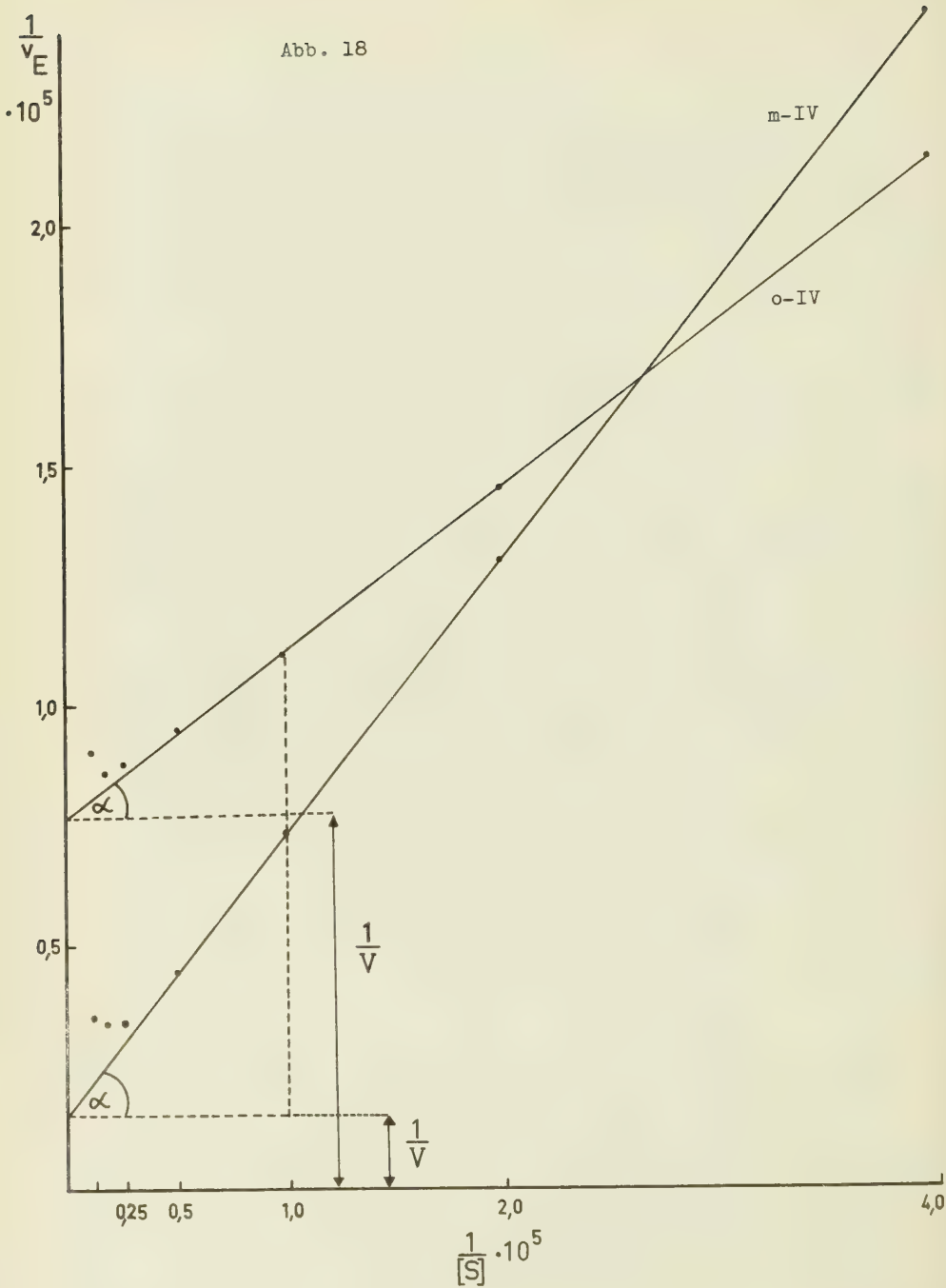
$$\underline{K_m = 4,3 \cdot 10^{-6}}$$

$$m - IV : \frac{1}{v} = 0,16 \cdot 10^5, \quad v = 6,25 \cdot 10^{-5}$$

$$\operatorname{tg} \alpha = 0,58 \cdot K_m = 0,58 \cdot 6,25 \cdot 10^{-5}$$

$$\underline{K_m = 3,6 \cdot 10^{-5}}$$

Abb. 18



4.3 Die Untersuchung der hydroxylionenkatalysierten Esterhydrolyse

4.3.1 Versuchsmaterial

0,25 n NaOH

Eine geeignete OH-Ionenkonzentration wurde in Vorversuchen an einer $2 \cdot 10^{-5}$ molaren Novokainlösung ermittelt. Die mit einer 0,25 n NaOH erreichte Hydrolysegeschwindigkeit $v_B = 0,180 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min. entsprach annähernd der Aktivität einer 20 %igen Serumendkonzentration ($v_E = 0,162 \cdot 10^{-5}$ Mol/Min). 10,00 g NaOH puriss. wurden auf einer Analysenwaage genau gewogen, in destilliertem Wasser gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Der Gehalt wurde gegen 0,1 n HCl (Methylorange als Indikator) eingestellt und im Verlauf der Untersuchungen mehrmals kontrolliert.

4.3.2 Arbeitsverfahren

Apparatur und Methodik waren die gleichen wie unter 4.2.2 beschrieben.

Die Hydrolyse wurde in reiner, 0,25 n NaOH durchgeführt. Um die Quarzküvetten nicht allzulange mit der Lauge in Berührung zu lassen, erfolgte ihre Temperierung auf $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ im Thermostaten in einem separaten Gefäß. Mit einer ebenfalls temperierten Pipette wurden 3 ml NaOH in die Meßküvette gebracht, die zum Temperausgleich nochmals für einige Minuten in das Küvettengehäuse gestellt wurde. Durch Zugabe der gewünschten Estermenge mittels der Mikrometerspritze wurde nach vorsichtigem Umschütteln die Reaktion eingeleitet und sofort die Anfangsextinktion (E_0) gemessen. (Zeit $t = 0$). Als Bezugslösung diente 0,25 n NaOH. Die Abstände der Messungen richtete sich nach der Hydrolysegeschwindigkeit der Verbindungen und erfolgte in Abständen von 15, 30, 60 und 120 Sekunden. Die Hydrolyse wurde als beendet angesehen, wenn sich die Endextinktion (E_∞) innerhalb von 15 Minuten nicht mehr veränderte. Im Re-

aktionsgemisch wurden anschließend die Spektren der entstandenen Benzoesäuren, bzw. substituierten Benzoesäuren gemessen. (Vgl. 3.3.2 und 4.2.2).

Durch den sehr großen Laugenüberschuß war die NaOH-Konzentration während der Versuche praktisch konstant.

4.3.3 Die Bestimmung der Hydrolysengeschwindigkeit v_B

Die für eine $2 \cdot 10^{-5}$ molare Novokainlösung erhaltenen Meßergebnisse sind als Beispiel in Tabelle XII aufgeführt. Da vom Einbringen des Esters bis zur ersten Extinktionsablesung etwa 15 Sekunden vergehen (vgl. 4.2.2), entsprach E_0 durch die schnellere Hydrolysengeschwindigkeit nicht mehr genau der eingesetzten Esterkonzentration. Zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit v_B mußte daher der Wert für E_0 aus den Folgeextinktionen extrapoliert werden.

Tabelle XII

Zeit t (sec)	Extinktion E	Extinktions- differenz	Mittel- wert
0	0,141	0,013	0,0118
60	0,128	0,013	
120	0,115	0,011	
180	0,104	0,012	
240	0,092	0,011	
300	0,081		
360	0,074		
420	0,066		
480	0,059		
540	0,053		
600	0,047		
...			
2040	0,010		

Der aus den Extinktionsdifferenzen, die während der ersten

fünf Minuten konstant sind, errechnete Mittelwert entspricht derjenigen Novokainmenge, die unter den angewandten Versuchsbedingungen maximal in einer Minute gespalten werden kann und das Maß für die hydroxylionenkatalysierte Hydrolysegeschwindigkeit ist. In diesem Fall,
 $v_B = 0,180 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/Min.}$

4.3.4 Die Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten k

Der Zusammenhang zwischen Esterkonzentration und Extinktion innerhalb einer Meßreihe läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken (152):

$$c = \frac{c_0 (E - E_\infty)}{(E_0 - E_\infty)}$$

c = Konzentration des noch vorhandenen Esters

c_0 = Anfangskonzentration zur Zeit $t = 0$

E_0 = Anfangsextinktion

E_∞ = Endextinktion

Die Versuchsbedingungen waren so gewählt, daß die Esterkonzentration und die Konzentration der Hydrolyseprodukte die einzigen variablen Größen waren. (Vgl. dazu 2.2.1 und 4.3.2).

Durch Integration der Gleichung 4, Seite 16, erhält man für die zeitabhängige, veränderliche Esterkonzentration folgenden Ausdruck:

$$c = c_0 \cdot e^{-k \cdot t}, \text{ logarithmiert ergibt dies:}$$

$$\log c = \log c_0 - 0,4343 \cdot k \cdot t.$$

c ist aber proportional $E - E_\infty$. Eingesetzt erhält man:

$$\log (E - E_\infty) = \log (E_0 - E_\infty) - 0,4343 \cdot k \cdot t$$
$$k = \frac{1}{0,4343 \cdot t} \cdot \log \left[\frac{(E_0 - E_\infty)}{(E - E_\infty)} \right]$$

Die in Tabelle VII für k angegebenen Zahlenwerte, wurden durch Auswertung von drei, dem Beispiel in Tabelle XII entsprechenden Meßreihen verschiedener Esterkonzentrationen - $2 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$ und $6 \cdot 10^{-5}$ Mol/l - erhalten. Am Beispiel des Novokains ist hier die Bestimmung von k in Tabelle XIII durchgeführt.

Tabelle XIII

Zeit t (sec)	$k \cdot 10^{-3} [\text{sec}^{-1}]$ (T = 37,0°C)		
	Novokainkonzentration		
	$2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l	$4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l	$6 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
60	(1,76)	(1,84)	1,98
120	1,98	1,92	1,88
180	1,88	2,03	1,92
240	1,98	2,00	1,98
300	2,00	2,00	2,00
360	2,00	2,01	2,00
420	2,04	2,05	2,06
480	1,96	2,05	2,03
540	2,08	2,08	2,03
Mittelwert:	1,99	2,01	2,00

Aus den Mittelwerten der drei Reihen errechnet sich die Hydrolysegeschwindigkeitskonstante für Novokain in 0,25 n NaOH, bei einer Temperatur von 37,0°C mit: $k = 2,00 \cdot 10^{-3} [\text{sec}^{-1}]$.

Dem Verband der chemischen Industrie (Fonds der Chemischen Industrie) sei für die wertvolle Unterstützung der vorliegenden Arbeit vielmals gedankt.

Zusammenfassung

Es wurde die enzym- und hydroxylionenkatalysierte Hydrolyse einiger lokalanästhetisch wirksamer Ester, sowie einer homologen Reihe von o-, m- und p-Alkoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthylestern untersucht. Als Grundlage dienten die eingangs erwähnten, heute gültigen Vorstellungen über die Esterhydrolyse.

Das Enzymsystem, mit dem die Versuche durchgeführt wurden, bestand aus einer Blutserumkonserve und einer daraus durch Dialyse hergestellten "gereinigten Esteraselösung". Die Anwendbarkeit des Verfahrens zur Messung der Hydrolysen-geschwindigkeit beruht auf der Verschiedenheit der UV-Absorptionsspektren der Ester und ihrer Spaltprodukte.

Der Einfluß der verschiedenen Substituenten auf die Spektren der Ester, sowie auf die enzymatische und alkalische Hydrolyse wurde untersucht, wobei sich für einige Verbindungsgruppen Zusammenhänge zwischen Spektralverschiebungen und Hydrolysen-geschwindigkeit ergaben.

Eine bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Esterkonzentration bei der Mehrzahl der Verbindungen festgestellten Hemmung der für den Abbau verantwortlichen Esterase, konnte als "kompetitive Hemmung durch Substratüberschuß" identifiziert werden. Ferner wurden die Michaeliskonstanten bestimmt und der Einfluß der Serumkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht.

Es wird ein Verfahren beschrieben, mit dem in Anlehnung an die Methode von W. K a l o w die alkalische Hydrolysen-geschwindigkeit spektrofotometrisch ermittelt wurde.

Dabei ergab sich für $v_{B(o)} : v_{B(m)} : v_{B(p)}$ der n-Alkoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthylester ein konstantes Verhältnis. Außerdem wurden die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt.

Die Beziehungen zwischen enzym- und hydroxylionenkatalysierter Hydrolyse der untersuchten gebräuchlichen Lokalanästhetika gestalteten sich folgendermaßen.

Der PAB-Ester eines sekundären Aminoalkohols (Tutocain) wird in jedem Fall am langsamsten gespalten. In der Reihe der PAB-Ester primärer Aminoalkohole wird der Prototyp Novokain als am einfachsten gebaute Verbindung auch am schnellsten abgebaut. Der 2-n-Butoxy-PAB-ester (Sympocaine) wird jedesmal schneller hydrolysiert als der 2-n-Propoxy-PAB-ester (Propoxycaine). Im übrigen verhalten sich die unter physiologischen Bedingungen ermittelten Hydrolysegeschwindigkeiten zwischen vergleichbaren Substanzen zu den alkalischen Hydrolysegeschwindigkeiten entgegengesetzt. So wird Larocain unter dem Einfluß des Serums schneller gespalten als Butacaine, Pantocain schneller als Cornecain und Stadacain schneller als Intracaine.

Für die enzym- und hydroxylionenkatalysierte Hydrolyse besteht bei den Alkoxybenzoesäureestern der homologen Reihe eine Übereinstimmung innerhalb der stellungsisomeren Verbindungen. Grundsätzlich sind die p-Verbindungen stabiler als die o-Verbindungen und letztere wieder schwerer hydrolysierbar als die m-Verbindungen. Bei der Mehrzahl der o- und m-AOBE erfolgt die enzymatische Spaltung rascher als die alkalische, während umgekehrt die p-AOBE, mit Ausnahme der p-n-Butoxyverbindung durch Serum langsamer abgebaut werden als in alkalischem Milieu.

Ein feststellbarer Zusammenhang mit der enzymatischen Hydrolyse konnte weder für die Anästhesiedauer noch für die anästhetische Wirkung gefunden werden. Dagegen konnten die Beziehungen zwischen hydroxylionenkatalysierter Hydrolyse, Konstitution und pharmakologischer Wirkung für die homologe Reihe der Alkoxybenzoesäure- β -diäthylaminoäthylester bestätigt werden.

In Fortführung der umfangreichen Untersuchungen von C. R o h m a n n und Mitarbeitern über Konstitution, phy-

sikalisch-chemische Eigenschaften und pharmakologische Wirkung von Arzneistoffen, wurde in der vorliegenden Arbeit an Hand einer relativ einfach zu übersehenden Reaktion nämlich der Esterspaltung, die Einwirkung eines im menschlichen Organismus vorkommenden Enzymsystems auf lokalanästhetisch wirksame Benzoessäureester untersucht.

Literaturverzeichnis

- (1) J. Büchi, Arzneimittel-Forsch. 1, 1 (1960)
 X. Perlia Arzneimittelforsch. 2, 117 (1960)
- (2) E. Fourneau J. Pharm. Chem. 2, 56, 397 (1910)
- (3) E. Poulson in Heffters Handbuch d. exp. Phar-
 makol. 21, 103 (1920)
- (4) W. Laubender in Heffters Handbuch d. exp. Phar-
 makol. Erg. Werk 8, 21 Berlin 1939
- (5) C. Rohmann, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. phar-
 B. Scheurle maz. Ges. 274, 110, 225, (1936)
- (6) C. Rohmann, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. phar-
 A. Koch maz. Ges. 276, 189 (1938)
- (7) C. Rohmann, L. Kahl, Dissertation,
 L. Kahl Jena 1939
- (8) C. Rohmann, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. phar-
 W. Haas maz. Ges. 278, 425 (1940)
- (9) C. Rohmann, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. phar-
 H.D. Wilm maz. Ges. 284, 324 (1951)
- (10) C. Rohmann, G. Helmstaedter, Dissertation,
 G. Helmstaedter Frankfurt a. M. 1954
- (11) C. Rohmann, Th. Eckert, Dissertation,
 Th. Eckert Frankfurt a. M. 1954
- (12) C. Rohmann, H. Ritser, Dissertation,
 H. Ritser Frankfurt a. M. 1955
- (13) C. Rohmann, T. Wischniewski, Dissertation,
 T. Wischniewski Frankfurt a. M. 1957
- (14) C. Rohmann, H. Hoffmann, Dissertation,
 H. Hoffmann Frankfurt a. M. 1961
- (15) R.A. Hatcher, J. Pharmacol. exp. Therapeut.
 C. Eggleston 8, 385 (1916)
- (16) L. Eerland, Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam
 W. Storm van Proc. 28, 735 (1920)
 Leeuwen cit.: C. 20 III, 895
- (17) W. Wiechowski Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.
 Pathol. Pharmakol. 46, 155 (1901)
- (18) H.A. Oelkers, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.
 W. Rätz Pathol. Pharmakol. 170, 246 (1933)

- (19) M. Hotz Dissertation, Zürich, 1922
cit.: Lit.-Stelle (52)
- (20) H.W. Glasenap, in Heffters Handbuch d. exp.
U. Mussi, Pharmakol. Berlin 1939
Sonnet-Moret
- (21) A.D. MacDonald, J. Pharmacol. exp. Therapeut.
M.C.G. Israels 44, 359 (1932)
- (22) J.G. Dunlop J. Pharmacol. exp. Therapeut.
 55, 464 (1935)
- (23) K. Bullock, J. Pharmacol. exp. Therapeut.
A.D. MacDonald 62, 39 (1939)
- (24) B.B. Brodie, J. Pharmacol. exp. Therapeut.
P.A. Lief, 94, 359 (1948)
R.J. Poet
- (25) R. Gerisch, Dtsch. dentist. Z. 4, 562 (1950)
- (26) J. Yamamoto, Japan. J. Pharmacol. 3, 39 (1953)
K. Mikami, cit.: C.A. 48, 6596 (1954)
Y. Kurogochi
- (27) G. Taubmann, Dtsch. med. Wschr. 78, 320 (1953)
E. Tresser
- (28) F. Heim, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.
A. Haas Pathol. Pharmacol. 211, 458 (1950)
- (29) K.E. Schulte, Hoppe-Seyler's Z. physiolog. Chem.
H. Krause, 287, 239 (1951)
J. Kirschner
- (30) F. Heim Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.
 Pathol. Pharmacol. 208, 213 (1949)
- (31) W. Kalow J. Pharmacol. exp. Therapeut.
 104, 122 (1952)
- (32) M.H. Aven, Fed. Proc. 12, 299 (1953)
A. Light,
F.F. Foldes
- (33) W. Kalow Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.
 Pathol. Pharmacol. 215, 370 (1952)
- (34) F.F. Foldes, J. Amer. Chem. Soc. 77, 5149
D.L. Davis, (1955)
S. Shanor,
G. van Hees
- (35) W. Kalow, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.
M.O. Maykut Pathol. Pharmacol. 116, 418 (1956)
- (36) D. Glick J. Amer. Chem. Soc. 64, 564 (1942)

- (37) J.W. Legge, Med. J. Australia 29, 561 (1942)
E.B. Durie cit.: C.A. 37, 2077 (1943)
- (38) E. Engelhardt, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.
O. Loewi Pathol. Pharmacol. 150, 1 (1930)
- (39) K. Matthes J. Physiol. 70, 338 (1930)
cit.: C. 31, 1307
- (40) E. Stedman, Biochem. J. 26, 2056 (1932)
E. Stedman,
L.H. Easson
- (41) L.H. Easson, Biochem. J. 31, 1723 (1937)
E. Stedman
- (42) L.A. Mounter, Biochem. J. 54, 551 (1953)
V.P. Whittaker
- (43) D. Richter, Biochem. J. 36, 746 (1942)
P.G. Croft
- (44) B. Mendel, Biochem. J. 37, 473 (1943)
D.B. Mundell,
H. Rudney
- (45) C.M. Sturge, Biochem. J. 47, 518 (1950)
V.P. Whittaker
- (46) L.A. Mounter, Biochem. J. 47, 525 (1950)
V.P. Whittaker
- (47) M.G. Levine, Proc. Soc. exp. Biol. Med.
R.E. Hoyt, 73, 100 (1950)
A.A. Suran
- (48) W.N. Aldridge, Biochem. J. 53, 62, 110 (1953)
- (49) W. Pilz Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
328, 1 (1962)
328, 97 (1962)
- (50) R. Hazard, C. R. Séances Soc. Biol.
P. Pignard, Filiales 143, 1425 (1949)
A. Cornec
- (51) B. Flaschenträger, Physiologische Chemie II,
E. Lehnartz Berlin 1954
- (52) H. Killian Lokalanästhesie und Lokalanästhe-
tika, Stuttgart 1959
- (53) E. Stedman, Biochem. J. 29, 2107 (1935)
E. Stedman
- (54) B. Kisch, Exptl. Med. Surg. 1, 51 (1943)
H. Koster, cit.: C.A. 37, 3109 (1943)
E. Strauß

- (75) R. Hazard, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales
J. Ravasse 139, 13 (1945)
142, 1425 (1949)
- (76) W. Oelssner Pharmaz. 7, 133 (1952)
- (77) K.H. Boltze, Pharmaz. 10, 713 (1955)
H. Hofmann,
H. Katzmann
- (78) J. Richter Arzneimittel-Forsch. 7, 200 (1957)
- (79) K.H. Schmidt, Hoppe-Seyler s Z. physiol. Chem.
Ch. Kölbl 281, 7 (1944)
- (80) G. Wagner Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. phar-
maz. Ges. 286, 232 (1953)
- (81) G. Wagner Pharmaz. 9, 556 (1954)
- (82) G. Wagner, Pharmac. Acta Helvetiae
U. Zimmer 30, 385 (1955)
- (83) G. Szasz, Acta pharmac. hung. 25, 201 (1955)
C. Khin cit.: C. 58, 4867
- (84) U. Zimmer Die Krankenhaus-Apotheke
7, 26 (1957)
- (85) L. Castagnola, Schweiz. Mschr. Zahnheilkunde
A. Marangoni 67, 621 (1957)
A. Massarotti,
A. Riva
- (86) E. Hannig, Pharmaz. 14, 153 (1959)
W. Karan
- (87) A. Lauffs Apotheker-Ztg. 42, 621 (1927)
- (88) W. Eissner Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. phar-
maz. Ges. 268, 322 (1930)
- (89) E. Havinga Recueil Trav. chim. Pays-Bas
60, 897 (1941)
cit.: C. 42 I, 1024
- (90) M. Perez Ann. Chim. analyt. 25, 37 (1943)
- (91) E. Zöllner, Pharmaz. Zentralhalle Deutschland
G. Vastagh 96, 199 (1957)
- (92) E. Zöllner-Iván Acta pharmac. hung. 25, 108 (1955)
cit.: C. 58, 3974
- (93) K. Soehring, Pharmaz. 4, 64 (1949)
M. Pape

- (94) K. Soehring, Arzneimittel-Forsch. 6, 352 (1956)
H.H. Frey,
C.H. Schulz
- (95) F.J. Bandelin, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.
C.R. Kemp 18, 470 (1946)
cit.: C.A. 40, 6209 (1946)
- (96) D.J. Graubard, Anesthesiol. 8, 236 (1947)
R.W. Robertazzi,
M.C. Peterson
- (97) A.S.V. Burgen, Brit. J. Pharmacol. 3, 128 (1948)
C.A. Keele
- (98) B. Kisch, Exptl. Med. Surg. 1, 66 (1943)
E. Strauß cit.: C.A. 37, 3113 (1943)
- (99) A. Goldberg, Arch. Surg. 46, 49 (1943)
H. Koster, cit.: C.A. 37, 1493 (1943)
R. Warshaw
- (100) A. Riva, Pharmac. Acta Helvetiae
E. Gatti 32, 97 (1957)
- (101) K.S. Ting, J. Lab. clin. Med. 34, 822 (1949)
J.M. Coon,
A.C. Conway
- (102) J.G. Allen, Current Res. Anesthesia Analgesia
H. Livingstone 21, 285 (1942)
cit.: C.A. 37, 465 (1943)
- (103) K.S. Overgaard Acta pharmacol. toxicol.
 1, 153 (1945)
cit.: C.A. 40, 6155 (1946)
- (104) P. Terp Acta pharmacol. toxicol.
 6, 269 (1950)
cit.: C.A. 48, 954 (1954)
- (105) P. Cheramy J. Pharmac. Chim. 30, 408 (1924)
 cit.: C.A. 19, 1325 (1925)
- (106) M. Yamagishi Annu. Rep. Takeda Res. Lab.
 10, 35 (1951)
cit.: C.A. 46, 11582 (1952)
- (107) E.E. Vonesch, Rev. farm. 94, 104 (1952)
O.A. Guagnini cit.: C.A. 46, 11581 (1952)
- (108) E.G. Feldmann J. Amer. pharmac. Assoc.
 48, 197 (1959)
- (109) M.Z. Barakat, Drug Standards 27, 27 (1959)
S.K. Shehab, cit.: C.A. 53, 18385 (1959)
M. El-Shabrawi

- (110) J.M. Hanquin, J. Pharmac. Belgique
C. Lapière 10, 246 (1955)
- (111) K. Steiger, Pharmac. Acta Helvetiae
F. Hippenmeyer 24, 443 (1949)
- (112) F.J.R. Beattie Biochem. J. 30, 1554 (1936)
- (113) J.G.L. Harthon, Farmac. Revy 53, 507 (1954)
R.W.U. Mayer cit.: C.A. 48, 13167 (1954)
- (114) F. Weiss Pharmaz. Zentralhalle Deutschland
92, 77 (1953)
92, 311 (1953)
- (115) A. Häußler Arch. Pharmaz. Ber. deutsch. phar-
maz. Ges. 26, 133 (1956)
- (116) H. Koster, J. Lab. clin. Med. 21, 1096 (1936)
A. Shapiro,
E. Posen
- (117) A. Sa, An. Asoc. quim. argent.
A.D. Marsico 31, 60 (1943)
cit.: C.A. 38, 5746 (1944)
- (118) G. Valette Bull. Sci. pharmacol.
40, 28 (1933)
cit.: C. 33 II, 2300
- (119) E. Schulek, Z. analyt. Chem. 102, 186 (1935)
J. Floderer
- (120) C. Rohmann, Süddtsch. Apotheker-Ztg.
U. Rohmann 76, 472 (1936)
- (121) F. Girault, J. Pharmac. Chim. 20, 584 (1934)
J. Girault
- (122) J. Rae Pharmac. J. 127, 394 (1931)
- (123) F. Cotta-Ramusino Ann. Chimica 42, 331 (1952)
R. Monacelli cit.: C. 53, 5382
- (124) S.A. Schou, Dansk Tidsskr. Farmaci
J. Abildgaard 5, 129 (1931)
cit.: C.A. 26, 5381 (1932)
- (125) J. Fijalkow, Arch. Pharmaz. Ber. deutsch. phar-
M. Jampolska maz. Ges. 270, 203 (1932)
- (126) G.C. Zanetti Atti accad. sci. Ferrara
26, 4 (1948)
cit.: C.A. 44, 9116 (1950)
- (127) A. Wankmüller Pharmaz. 4, 510 (1949)

- (128) E.H. Maier Klin. Wschr. 31, 285 (1953)
- (129) R. Dietzl Pharmaz. Zentralhalle Deutschland
79, 321 (1938)
- (130) D. Florentin,
R. Héros Ann. Chim. analyt. Chim. appl.
24, 31 (1942)
cit.: C.A. 37, 5550 (1943)
- (131) C.U. St.John J. Amer. pharmac. Assoc.
37, 343 (1948)
- (132) A.J. Biggs J. Pharmacy Pharmacol.
4, 479 (1952)
- (133) M.J. Pro,
R.A. Nelson,
W.P. Butler,
A.F. Mathers J. Assoc. off. agric. Chemists
39, 957 (1956)
- (134) E.G. Feldmann,
W. Lahler,
H.M. Koehler J. Amer. pharmac. Assoc.
47, 676 (1958)
- (135) M. Pestemer,
D. Brück in Houben-Weyl, Methoden d. Org.
Chem. III, 2, 657, Stuttgart 1955
- (136) H.A. Staab Einführung i. d. theoretische org.
Chem., Weinheim 1959
- (137) L. Doub,
J.H. Vandenbelt J. Amer. Chem. Soc. 69, 2714 (1947)
- (138) W.D. Kumler,
L.A. Strait J. Amer. Chem. Soc. 65, 2349 (1943)
68, 1184 (1946)
- (139) H. Mohler Lösungsspektren, Jena 1937
- (140) M. Pestemer,
D. Brück Lit.-Stelle (135) S. 660
- (141) M. Pestemer,
D. Brück Lit.-Stelle (135), S. 662
- (142) K.L. Wolf,
W. Herold Z. physikal. Chem. Abt. B
13, 201 (1931)
- (143) H.A. Staab Lit.-Stelle (136), S. 365
- (144) L. Lang Absorption Spectra in the UV and
visible Region, Budapest 1961
- (145) K.J. Netter Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.
Pathol. Pharmacol. 235, 498 (1959)
- (146) H. Lineweaver,
D. Burk J. Amer. Chem. Soc.
56, 658 (1934)

- (147) H. Netter Lit.-Stelle (62), S. 586
- (148) R.M. Levine, J. Pharmacol. exp. Therapeut.
B.B. Clark 113, 272 (1955)
- (149) F.F. Foldes, Anesthes. 17, 187 (1956)
D.L. Davis,
O.J. Plekss
- (150) K. Soehring, Ärztl. Forschung 4, 339 (1950)
F. Djelar-Oglou
- (151) H. Netter Lit.-Stelle (62), S. 577
- (152) A.V. Willi Pharmac. Acta Helvetiae
32, 635 (1958)
- (153) C. Smith, Z. physikal. Chem. 117, 99 (1925)
H. Olsson
- (154) F. Herr, Acta physiol. Acad. Sci. hung.
S. Balog, 11, 93 (1957)
N. Jobbágy cit.: C. 58, 8120
- (155) C. Rohmann, G. Heil, Dissertation,
G. Heil Frankfurt a.M. 1956
- (156) W. Laubender, L. Hunn, Dissertation,
L. Hunn Frankfurt a.M. 1960
- (157) U. Dardenne, Graefes Arch. ophthalmol. verein.
W. Leydhecker, Arch. Augenheilkunde
E. Helfrich 158, 434 (1957)
- (158) W. Keil, Arzneimittel-Forsch.
E. Rademacher 1, 154, 218 (1951)
- (159) P.P. Koelzer, Arzneimittel-Forsch.
K.H. Wehr 8, 181 u.a. (1958)
- (160) F.P. Luduena, Fed. Proc. 9, 297 (1950)
- (161) F.P. Luduena, J. Pharmacol. exp. Therapeut.
J.O. Hoppe 104, 40 (1952)
- (162) F.P. Luduena, Science (Washington), 118, 138
R.O. Clinton, (1953)
S.C. Laskowski
- (163) F.P. Luduena Anesthes. 16, 751 (1955)
- (164) F.P. Luduena, J. Amer. Pharmac. Assoc.
J.O. Hoppe 44, 393 (1955)
- (165) F.P. Luduena, J. Pharmacol. exp. Therapeut.
J.O. Hoppe 117, 89 (1956)

- (166) Mitteilung der Behringwerke
Marburg/Lahn
- (167) S.P.L. Soerensen Biochem. Z. 7, 45 (1908)

Lebenslauf

Am 26. Dezember 1929 wurde ich, Dieter Frank, als Sohn des techn. Angestellten Theo Frank und seiner Ehefrau Fridl, geb. Gronbach, in Frankfurt am Main geboren. Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich vom Herbst 1940 an zunächst bis März 1945 die Oberschule in Dinkelsbühl-Mfr. Nach halbjähriger Unterbrechung durch Wehrdienst und Kriegsgefangenschaft trat ich wieder in dieselbe Schule ein und legte dort im Juli 1949 meine Reifeprüfung ab. Nach einer sechsmonatigen Tätigkeit in der Pharmazeutischen Industrie und einer zweijährigen Praktikantenzeit in der Schwanen-Apotheke in Frankfurt am Main, bestand ich im Frühjahr 1952 die pharmazeutische Vorprüfung in Wiesbaden. Mit dem Wintersemester 1952/53 begann ich das Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und legte im Sommersemester 1955 die pharmazeutische Staatsprüfung ab. Anschließend arbeitete ich ein halbes Jahr als Kandidat der Pharmazie in einer öffentlichen Apotheke und erhielt im Frühjahr 1956 die Approbation als Apotheker. Im Sommersemester 1956 setzte ich meine naturwissenschaftlichen Studien an der Johann Wolfgang Goethe-Universität fort. Nach einer vertieften organisch-chemischen Ausbildung am Pharmazeutischen Institut begann ich unter der Leitung seines Direktors, Herrn Prof. Dr. C. Rohmann, mit der Anfertigung meiner Dissertation. Seit August 1958 verwaltete ich am gleichen Institut die Stelle eines wissenschaftlichen Assistenten.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. C. Rohmann, danke ich aufrichtig für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie für die großzügige Unterstützung und stets verständnisvolle Förderung in wissenschaftlicher und persönlicher Hinsicht.

